

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**USO DO ÁCIDO MEFENÂMICO EM RECEPTORAS DE
EMBRIÕES EQUINOS**

TATIANA CABRERA

BOTUCATU – SP
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TATIANA CABRERA

**USO DO ÁCIDO MEFENÂMICO EM RECEPTORAS DE EMBRIÕES
EQUINOS**

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para a obtenção do
título de mestre.

Orientador: Prof.Dr. José Antônio Dell’Aqua
Junior

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Cabrera, Tatiana.

Uso do ácido mefenâmico em receptoras de embriões equinos / Tatiana
Cabrera. – Botucatu: [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia.

Orientador: José Antônio Dell'Aqua Júnior

Capes: 50504002

1. Equino - Embrião. 2. Transferência de embriões.

Palavras-chave: Ácido mefenâmico; Éguas; Progesterona; Receptora, Transferência
de embrião.

Nome do Autor: Tatiana Cabrera

Título: USO DO ÁCIDO MEFENÂMICO EM RECEPTORAS DE EMBRIÕES
EQUINOS

Botucatu, 30 de Janeiro de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Antônio Dell' Aqua Junior

Prof.Dr. Marco Antônio Alvarenga

Prof.Dr. Marcio Teoro Carmo

DEDICATÓRIA

Dedico minha tese ao meu pai (*in memoriam*), que sempre me incentivou e apoiou meus estudos, minha carreira. Ao homem que foi um exemplo de otimismo, força e alegria. Saudades!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por todas as oportunidades que acontecem na minha vida.

Ao meu tio, Cláudio, que considero como meu segundo pai, por sempre ter acreditado em meu potencial. Graças ao senhor devo minha carreira de veterinária. Obrigada por ser esse homem generoso e íntegro.

À minha mãe, que é a mulher mais corajosa e forte que conheço. Que não mede esforços para me ajudar, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida, que me ensinou a lutar pelos meus ideais e que me ama incondicionalmente. Você é meu exemplo de vida!

Ao Thiago, meu namorado, meu parceiro, meu companheiro. Agradeço por me apoiar, me amar e me aguentar... Te amo infinitamente, mais que tudo.

Aos meus irmãos Fernando e Júnior, por incentivarem meu mestrado, minha profissão e por serem meus grandes amigos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Antônio Dell'Aqua Junior, pelo mestrado e pela amizade e aprendizado durante esse período.

Ao professor Marco Antônio Alvarenga pela sugestão da idéia deste projeto em uma de suas aulas

Também aos professores: Frederico Ozanam Papa, Nereu Carlos Prestes, Eunice Oba, Cezinande de Meira pela ajuda e pelos ensinamentos no decorrer do mestrado.

Aos médicos veterinários Mário e Marília e a toda equipe de funcionários e estagiários da central de reprodução eqüina Genetic Jump que colaboraram para a execução deste experimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária e a todos os colegas da pós graduação pelo convívio e colaboração.

À todos que diretamente ou indiretamente colaboraram para a execução deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Número de Inovulações e porcentagem de prenhez nas éguas receptoras dos grupos G1, G2 e G3.....	18
Tabela 2- Taxa de gestação (%) aos 15 e 30 dias e porcentagem de morte embrionária nas éguas receptoras dos grupos G1, G2 e G3.....	18
Tabela 3- Concentrações médias de progesterona (ng/ml) em receptoras que permaneceram gestantes nos grupos G1, G2 e G3.....	19
Tabela 4- Concentrações médias de progesterona (ng/ml) em receptoras não gestantes nos grupos G1, G2 e G3.....	20
Tabela 5- Tempo de ocorrência da concentração sérica de progesterona <1 ng/ml nas receptoras não gestantes dos grupos G1, G2 e G3.....	21
Tabela 6- Classificação do tônus uterino no dia da TE em relação a taxa de prenhez (%) nas receptoras dos grupos G1, G2 e G3.....	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Média da Concentração de Progesterona (ng/ml) nas receptoras gestantes.....	19
Figura 2- Média da Concentração de Progesterona (ng/ml) nas receptoras não gestantes.....	21

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

% - porcentagem

° C - graus Celsius

a – alfa

AINE- antiinflamatório não esteroidal

ANOVA - análise de variância

CL- corpo lúteo

COX- cicloxigenase

D- dia

G- grama

IA - inseminação artificial

IM - intramuscular

Kg- quilo

n - número de animais

ng- nanograma

mg- miligrama

ml- mililitro

PGE₂= Prostaglandina E₂

PGF₂ α = Prostaglandina F₂ α

TE- transferência de embrião

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Reconhecimento materno da gestação.....	4
2.2. Progesterona.....	6
2.3. Sincronia entre doadora e receptora de embrião.....	8
2.4. PGF2 α e luteólise.....	9
2.5. Antiinflamatórios não esteroidais.....	10
3. OBJETIVO.....	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1. Local da pesquisa.....	14
4.2. Animais e grupos experimentais.....	14
4.3. Delineamento experimental.....	15
4.3.1. Produção dos embriões.....	15
4.3.2. Colheita, manipulação e transferência dos embriões.....	15
4.3.3. Palpação retal e exame ultrassonográfico uterino no dia da te ...	16
4.3.4. Colheita da amostra de sangue para dosagem de progesterona.	16
4.3.5. Diagnóstico de gestação.....	17
4.4. Análise estatística.....	17
5. RESULTADO.....	17
6. DISCUSSÃO.....	22
7. CONCLUSÃO.....	26
8. REFERÊNCIAS.....	27
9. TRABALHO CIENTÍFICO.....	36

CABRERA, T. **Uso do ácido mefenâmico em receptoras de embriões equinos. Estudo experimental em éguas.** Botucatu, 2012. 101p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Com o intuito de estender um aceitável intervalo entre a ovulação da receptora e dia da transferência de embrião (TE), o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ácido mefenâmico na capacidade de manutenção da função do corpo lúteo em receptoras que se encontravam no dia 10 do ciclo (D10), bem como verificar as taxas de prenhez após a transferência do embrião. Foram transferidos 48 embriões para receptoras no dia 10 do ciclo divididos em três grupos experimentais: Grupo 1 controle (n=18); Grupo 2 (n=15) receptoras tratadas com 1g de ácido mefenâmico por via oral desde o oitavo até o décimo sexto dia após a ovulação; Grupo 3 (n=15) receptoras tratadas com 1g de ácido mefenâmico por via oral no dia da transferência e por mais dois dias. Seis dias após a transferência dos embriões foi confirmada a gestação por ultrassonografia e repetida aos 30 dias. Para análise das porcentagens de gestação e classificação uterina no dia da TE foi utilizado o Teste de Fisher e para os valores obtidas da dosagem sérica de progesterona foi utilizado o teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey. O grupo controle apresentou 33,3% de taxa de gestação (6/18). Os grupos 2 e 3 apresentaram 40,0% (6/15) e 33,3% (5/15), respectivamente. Nas éguas não gestantes, os três grupos apresentaram queda progressiva na concentração média de progesterona, significativamente a partir do 12º dia pós ovulação, não havendo interferência no tempo da ocorrência da luteólise. As taxa de prenhez em receptoras D10 apresentaram índices satisfatórios em receptoras com bom tônus uterino e cervical no dia da TE. Conclui-se que o ácido mefenâmico não impediu a luteólise e não melhorou as taxas de prenhez das receptoras no dia 10 do ciclo estral.

Palavras chave: ácido mefenâmico, éguas, progesterona, receptora, transferência de embrião.

CABRERA, T. **Use of mefenamic acid in equine embryo recipients. Experimental study in mares.** Botucatu, 2012. 101p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

In order to extend an acceptable interval between ovulation of the recipient and the day of the embryo transfer (ET), the purpose of this study was to evaluate the effect of mefenamic acid in the ability to maintain corpus luteum function in recipient mares that were on Day 10 (D10) of the estrous cycle, and to verify the pregnancy rate after embryo transfer. 48 embryos were transferred into recipients on Day 10 of the cycle divided into three experimental groups: Group 1 control (n = 18); Group 2 (n = 15) recipients treated with 1g mefenamic acid orally since the eighth until the tenth sixth days after ovulation; Group 3 (n = 15) recipients treated with 1g mefenamic acid orally on day of transfer and for two more days. Six days after ET, pregnancy was confirmed by ultrasound and repeated at 30 days. For analysis of percentages of pregnancy and classification uterine on ET day was used Fisher's exact test and the values obtained from the serum progesterone was used ANOVA followed by Tukey test. The control group showed a 33.3% pregnancy rate (6/18). Groups 2 and 3 presented 40.0% (6/15) and 33.3% (5/15), respectively. In non-pregnant mares, all three groups showed a progressive decrease in the mean concentration of progesterone significantly from day 12 post ovulation, without interference in the time of the occurrence of luteolysis. The pregnancy rate in recipients on Day 10 showed satisfactory rates in recipients with good uterine tone and neck on the day of ET. It is concluded that mefenamic acid did not prevent luteolysis and did not improve pregnancy rates of recipients on day 10 of the estrous cycle.

Key words: mefenamic acid, mares, progesterone, recipient , embryo transfer.

1. INTRODUÇÃO

Os índices de recuperação embrionária e taxas de prenhez pós inovulação determinam a eficiência de um programa de TE. Fatores inerentes às doadoras, receptoras e ao próprio embrião têm sido cada vez mais estudados com intuito de minimizar perdas embrionárias e aumentar o sucesso da transferência. Segundo VANDERWALL (2000), a seleção e o manejo adequados de éguas receptoras podem ser os fatores mais importantes para o sucesso de um programa de transferência de embriões em eqüinos.

No reconhecimento materno da gestação o concepto sinaliza ao organismo materno para prolongar a vida do corpo luteo primário e assim assegurar um contínuo suplemento de progesterona cuja sobrevivência embrionária e desenvolvimento são criticamente dependentes (ALLEN, 2001; KASTELIC et al., 1987; SPENCER et al., 2004). A incidência de morte embrionária antes dos sessenta dias de gestação varia de 2.6% a 24%, apresentando uma média de 8,6%, o que gera grandes prejuízos na criação eqüina (VANDERWALL, 2008).

O ambiente uterino se altera marcadamente sobre a influência da progesterona e um embrião exposto a um útero assincrônico pode estar sujeito a fatores de desenvolvimento e níveis hormonais não correspondentes a fase na qual ele se encontra (BARNES, 2000). Assim, o intervalo de ovulação entre receptora e doadora deve ser levado em conta na seleção da receptora. A utilização de receptoras em condições naturais antes de quatro dias após a ovulação não tem sido recomendado na literatura, observando-se que, a partir do 9º dia, a taxa de prenhez piora bastante após a transferência, inviabilizando a utilização a partir deste dia (CAIADO et al., 2007).

Wilsher et al. (2004) investigaram o efeito do tratamento com o antiinflamatório ácido meclofenâmico em receptoras ovuladas 2 e 3 dias antes da doadora e observaram que o índice de prenhez em receptoras tratadas e não tratadas foi de 81% e 44%, respectivamente. O aumento no período de utilização da receptora é sempre um desafio que possibilita recompensas na redução do custo da TE em equinos (JASKO, 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ácido mefenâmico na capacidade de manutenção da função do corpo lúteo em receptoras que se encontravam no dia 10 do ciclo (D10), bem como verificar as taxas de prenhez após a TE.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Reconhecimento materno da gestação

O embrião equino permanece esférico e envolvido por uma cápsula acelular de glicoproteína, onde se movimenta continuamente através da entrada no lúmen uterino por propulsões estimuladas pelas contrações miometriais. Quando o embrião alcança o estágio de desenvolvimento de mórula compacta no dia 5 (dia 0= dia da ovulação) começa a secretar grandes quantidades de prostaglandina E2 (PGE2) que atua localmente para relaxar fibras musculares lisas da parede do oviduto causando a abertura do esfíncter ampola istmo e assim permitindo o embrião a atravessar a entrada do útero (GASTAL et al., 1998; STOUT e ALLEN, 2001).

Na espécie eqüina, os óvulos não fertilizados são retidos na junção da ampola istmo do oviduto onde são degenerados lentamente. A habilidade do oviduto em diferenciar entre oócito e embriões em desenvolvimento está baseada no fato de que somente estes são capazes de secretar PGE2 (GAIVÃO e STOUT, 2007).

Para o sucesso do reconhecimento e manutenção da prenhez, as secreções uterinas (histiotrofo) são estimuladas pela migração do concepto, que consiste na única fonte de nutriente no período antes da formação definitiva da corioalantóide; cuja formação não começa antes dos 45 dias de gestação (McDOWELL et al., 1988; SHARP et al., 1989; SPENCER et al., 2004).

As prostaglandinas são importantes durante o início do reconhecimento materno da gestação em mamíferos. A PGE2 é considerada luteoprotetiva em

algumas espécies. Portanto, a interação entre componentes da via das prostaglandinas e seus receptores e enzimas, devem ser investigada em conjunto, para entender completamente os eventos que acontecem durante o reconhecimento precoce da gestação, como a prevenção de luteólise e manutenção da prenhez. A interação equilibrada entre as enzimas e receptores de prostaglandinas dentro do útero durante o reconhecimento embrionário devem ser mantidos para proporcionar um ambiente adequado para o embrião, que primeiro deve inibir a luteólise e depois prosseguir para o processo de implantação (ATLI et al., 2010).

Na fêmea prenhe, a presença do concepto suprime a afinidade do aumento cíclico do número de receptores para ocitocina inibindo a síntese e secreção de prostaglandina F2 α (PGF2 α). Também tem sido sugerido que o endométrio da égua prenhe produz um potente inibidor da síntese de prostaglandina que bloqueia a conversão do ácido aracdônico para PGF2 α . Embora esses dois mecanismos possam trabalhar em conjunto para prevenir luteólise, o sinal bioquímico no qual o concepto eqüino “informa” a égua de sua presença e inicia esse processo ainda tem que ser identificado (GAIVÃO e STOUT, 2007).

Nos últimos anos, tem se tornado claro que tanto a ocitocina secretada pelo hipotálamo é quem sinaliza a síntese e liberação de pulsos luteolíticos de PGF2 α na égua (WATSON et al., 1997). Entretanto, em estudo realizado por Handler et al. (2006) a administração exógena de ocitocina de curta e longa ação, no D7 pós ovulação não afetou a secreção de progesterona, taxas de prenhez nem crescimento embrionário.

A cessação da migração do concepto nos dias 16-17 após ovulação, período em que ocorre a fixação parece resultar de um contínuo aumento do diâmetro do concepto combinado com um aumento acentuado no tônus uterino. Além do período de fixação do concepto e antes do desenvolvimento dos cálices endometriais ao redor dos 35 dias de gestação, o útero parece desenvolver tardiamente a habilidade de secretar PGF2 α em resposta a ocitocina. Sugerindo que uma prevenção contínua da luteólise no período dos dias 18-35 deva depender de um mecanismo alternativo (STOUT e ALLEN, 2002).

Nos bovinos o reconhecimento da gestação ocorre entre os dias 15 e 18 do ciclo, neste momento o embrião deverá enviar sinais ao endométrio que evitem a liberação de PGF2 α e a posterior lise do corpo lúteo, permitindo portanto, que ocorra a gestação (FRIZZO, 2002).

Uma molécula protéica, interferon, secretada pelo embrião entre os dias 16 e 26 de gestação foi identificado como a molécula antiluteolítica nos bovinos, cujo sinal parece ser responsável pelo reconhecimento maternal da gestação. O trofoblasto secreta esta proteína, inicialmente denominada de proteína trofoblástica bovina I. Devido a suas propriedades únicas e para distingui-la de outros interferons se tem a denominado de interferon- τ (DANET-DESNOYERS et al., 1994). A PGF2 α é sintetizada principalmente nas células epiteliais endometriais, embora as células do estroma sintetizem toda prostaglandina E. O interferon- τ atua principalmente sobre as células epiteliais como sinal parácrina antiluteolítica, evitando a liberação de PGF2 α e assegurando a manutenção de um corpo lúteo funcional (FRIZZO, 2002).

Na ausência do concepto, a égua retornará ao estro como resultado da luteólise, pela ação da PGF2 α , que é liberada por pulsos intermitentes ao redor dos 12-14 dias após a ovulação. A migração intrauterina do concepto parece ser necessária para assegurar freqüente interação com o endométrio de modo a suprimir adequadamente a secreção de PGF2 α (GAIVÃO e STOUT, 2007).

2.2 Progesterona

O corpo lúteo (CL) é o local de produção da progesterona, hormônio que promove o encerramento dos sinais de estro, mantém a égua não receptiva ao macho e prepara o útero par receber o embrião (ARRUDA, 1995).

Segundo Bergfelt e Adams (2007) a progesterona é necessária para interações físicas entre útero e embrião. As secreções de proteínas uterinas são aparentemente importantes na nutrição do concepto no inicio da gestação. A habilidade de o endométrio provir quantidade adequada de secreções depende em grande parte da progesterona. O total de proteína na secreção uterina ao longo do ciclo estral tem sido estudado e os resultados indicam que

o conteúdo total cai abruptamente com o declínio da progesterona. Quando ocorre a manutenção do corpo lúteo e a produção de progesterona se mantém, o conteúdo protéico da secreção uterina permanece elevado (ZAVY et al., 1979).

As informações sobre a relação entre ecotextura e morfologia do CL e a concentração plasmática de progesterona são controversas. PIERSON e GINTHER (1985) citam que o tamanho e a ecogenicidade luteal podem refletir na produção de progesterona. Entretanto, TOWNSON et al., (1989), FERREIRA (2000), NAGY et al., (2004) e CASTRO (2005) verificaram que o tamanho do CL parece não ter efeito significativo sobre a concentração plasmática de P4.

Embora a insuficiência lútea primária não tenha sido documentada, foi demonstrado que algumas éguas prenhes sofreram luteólise nos dias 14-16, apesar da presença de embrião no útero (GINTHER, 1985; VANDERWALL et al., 2000). Esta condição é caracterizada por edema proeminente das pregas endometriais e pode ser confirmada posteriormente pela demonstração de uma concentração plasmática de progesterona inferiores a 1 ng /mL. O uso de progesterona exógena pode prevenir a perda da gestação iminente, mas o tratamento deve ser continuado até que a égua constitua um CL acessório e / ou a produção de progesterona fetoplacental comece (VANDERWALL, 2008).

De acordo com Nett et al. (1976) e Arruda et al. (2001), o tamanho máximo do CL só será atingido 3 dias após a ovulação. Sendo que seu pico de atividade funcional gerará concentrações plasmáticas de progesterona em torno de 6 a 15 ng/mL, somente no dia 6 após a ovulação (ARRUDA, 1990; ARRUDA et al., 2001).

Alonso (2007) observou em seu experimento que éguas candidatas a receptora de embrião com morfoecogenicidades distintas apresentaram concentração plasmática de progesterona estatisticamente semelhante.

Em estudo realizado por Carnevale et al. (2000) éguas classificadas como aceitáveis (apresentando um CL definido e tônus uterino e cervical bom ou excelente) apresentaram taxa de prenhez de 70,3% (315/448), enquanto as éguas marginais (CL pequeno ou com imagem ruim ou tônus uterino e cervical pobre a ruim) tiveram 56,2% (50/89). Éguas com tônus uterino ruim a pobre

podem ter concentrações de progesterona circulantes mais baixas, o que poderia afetar o tônus do útero e cérvix (GINTHER, 1992).

Segundo Hayes e Ginther (1986) a progesterona tem que estar associada ao estrógeno para se obter um tônus uterino de máxima intensidade. As taxas de gestação obtidas em éguas em anestro tratadas com estrógeno por 3 dias antes da aplicação de progesterona foi semelhante ao das éguas ciclantes (Rocha Filho et al., 2004).

2.3 Sincronia entre doadora e receptora de embrião

Um embrião exposto a um útero assincrônico pode estar sujeito a fatores de desenvolvimento e níveis hormonais não correspondentes a fase na qual ele se encontra. Isto pode resultar em mudanças nas taxas de desenvolvimento ou na morte do embrião (BARNES, 2000).

Segundo Squires (2006) a janela de +1 (ovulação da receptora 1 dia antes da doadora) a - 3 (ovulação da receptora três dias depois da doadora) deve ser utilizada. Receptoras que ovularam depois da doadora geralmente são melhores candidatas do que aquelas que ovularam antes, particularmente se a ovulação tiver ocorrido 2 dias antes (MCKINNON e VOSS, 1992).

Fleury et al. (2006) observaram ser possível a utilização de receptoras no dia 3 pós ovulação, desde que estas apresentem bom tônus uterino na avaliação ginecológica. Segundo Alonso et al., (2010), receptoras de embrião com tônus uterino adequado podem ser utilizadas a partir do terceiro dia pós ovulação, com adequadas taxas de prenhez, sem suplementação exógena de progesterona já que as taxas de prenhez foram similares para as éguas nos dias 3 a 8 pós ovulação (D3, 75,90% (83); D4, 71,72% (198); D5, 71,49% (228); D6, 69,36% (173); D7, 76,87% (147), D8, 68,42% (76)).

Em experimento realizado por Carnevale et al. (2000) as taxas de perda embrionária foram significativamente maiores em receptoras usadas 7 ou 9 dias versus 5 ou 6 dias pós ovulação. Embriões foram recoletados de éguas receptoras após 4 dias da transferência, e as melhores taxas de prenhez

foram das éguas receptoras que ovularam no mesmo dia ou dois dias depois da doadora (KOBLSCHKE et al., 2008).

Um total de 77 embriões foi transferido em receptoras com 5, 6, 7 e 8 dias de ovulação e as taxas de prenhez foram 71,4%, 88,9%, 65,4% e 88,6%, respectivamente (Fleury et al., 2001). Foi observado portanto, que a idade do corpo lúteo das receptoras não exerceu influência sobre os índices de gestação.

Wilsher et al (2010) trabalhando com embriões D10 e os transferindo em uma janela de sincronia entre -4 (D14) e +9 (D1) relataram que a quantidade de progesterona produzida pela receptora com relação ao seu tempo de ovulação não pareceu ser um pré requisito para a sobrevivência do embrião. Eles observaram que houve influência no desenvolvimento embrionário quando não estão em sincronia, já que retardou o crescimento e a formação do alantoide e que independente da sincronia, o tempo de fixação embrionária foi de 17 dias.

Aumentar o período útil de utilização da receptora é sempre um desafio que possibilita recompensas na redução do custo da TE em eqüinos (JASKO, 2002).

2.4. PGF2 α e Luteólise

Na reprodução, as prostaglandinas estão envolvidas na liberação de gonadotrofinas, ovulação, regressão do corpo lúteo, motilidade uterina, parto e transporte de espermatozóides (FRIZZO, 2002).

O ácido araquidônico, estocado na membrana fosfolipídica, é o precursor primário das prostaglandinas. A síntese de PGF2 α nas células endometriais resulta de uma complexa cascata de eventos intracelulares que ocorrem de maneira altamente coordenada. Essa cascata envolve a ativação seqüencial da proteína acopladora do GTP que promove a ativação da fosfolipase C (PLC). A PLC estimula a conversão do fosfatidil inositol bifosfato em trifosfato inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 promove a liberação de cálcio pelo retículo endoplasmático aumentando as concentrações deste íon no citoplasma, o que ativa a PKC. Por outras vias, o diacilglicerol também estimula a atividade da

PKC. A fosfolipase A2 (PLA2) ativada pela PKC promove a liberação de ácido araquidônico da membrana fosfolipídica para a célula. O ácido araquidônico pela ação da cicloxigenase 2 (COX-2) transforma-se em prostaglandina H2 (PGH2) que por ação da prostaglandina sintase (PGS) é convertida em PGF2 α (BERTAN et al., 2006).

Segundo Battye et al (1988) e Gilbert et al (1990) a regressão prematura do corpo lúteo parece estar ligada à ação da cicloxigenase e posterior atividade de prostaglandina sobre o corpo lúteo.

Um dos efeitos da prostaglandina F2 α em nível de ovário é a diminuição do fluxo sanguíneo para o corpo lúteo, sendo esta diminuição devido a degeneração dos capilares luteais e não à vasoconstrição que as prostaglandinas podem causar. O efeito inicial da PGF2 α é exercida sobre as células luteais grandes, assim, tem-se demonstrado que nestas células existe maior concentração de receptores de alta afinidade para a PGF2 α que nas células luteais pequenas, além disso, as primeiras são mais sensíveis ao efeito luteolítico da PGF2 α (PATE, 1994).

2.5. Antiinflamatórios não esteroidais

Conhecidos pela humanidade há cerca de 100 anos, os compostos antiinflamatórios não esteróides (AINES) estão entre os agentes farmacológicos mais utilizados na prática médica. Apresentam um amplo espectro de indicações terapêuticas, como: analgesia, antiinflamação, antipirese, profilaxia contra doenças cardiovasculares (DUBOIS et al., 1998).

Após a absorção, os AINEs encontram-se, em sua maior porcentagem, ligados as proteínas plasmáticas (96-99%), portanto, o volume de distribuição é pequeno, permanecendo no plasma e fluidos extra celulares, principalmente por estarem em sua maior parte na forma ionizada. Verificou-se existirem pelo menos dois tipos de cicloxigenases, que determinam no organismo diferentes funções fisiológicas: a COX-1 e a COX-2. Os produtos da quebra do ácido araquidônico pela COX-1 levam à formação de prostaglandinas relacionadas com reações fisiológicas renais, gastrointestinais e vasculares; enquanto os

produtos originados pela cisão através da COX-2 levam à formação de prostaglandinas que participam dos eventos inflamatórios (TASAKA, 1999).

O ácido mefenâmico e o ácido flufenâmico (AINES) foram os primeiros compostos derivados de fenamatos a possuir potencial antiinflamatório e inibir os efeitos respiratórios da SRS-A (substância de reação lenta da anafilaxia) e bradicinina (BERRY e COLLIER, 1964; COLLIER e SHORLEY, 1963; WINDSOR et al., 1962). O ácido meclofenâmico, também pertencente à família dos fenamatos, tem uso aprovado em Medicina Veterinária e tem sido utilizado em cavalos há mais de 20 anos no tratamento de claudicação aguda e crônica e outros problemas musculoesqueléticos crônicos, além de também ser indicado no tratamento de doenças osteoartísticas (agudas e crônicas). É um inibidor irreversível da COX-1 e da COX- 2 e também atua fracamente sobre a 5- lipoxigenase. A vantagem deste AINE é o mínimo efeito colateral relacionado com seu uso (TASAKA, 1999).

O flunixin é um derivado trifluorado do ácido nicotínico, é um potente inibidor da biossíntese de prostaglandinas e seu mecanismo de ação, semelhantes aos demais antiinflamatório não esteróides, se dá pela inibição da cicloxigenase (ODENSVIK, 1995). Este fármaco foi utilizado com eficácia em caprinos por Battye et al. (1988), na tentativa de impedir a síntese de PGF_{2a} e conseqüente luteólise prematura dos CL formados após a superovulação, o que resultaria em baixa taxa de recuperação de estruturas. Traldi et al., (1996) em seu trabalho usando Flunixin Meglumine demonstrou uma eficiência altamente significativa na inibição da regressão prematura do CL, com 95,5% de eficácia na preservação dos CL, contra apenas 51,6% do grupo não tratado com esse fármaco.

Foi sugerido que a manipulação e distensão da vagina e cervix podem estimular a secreção endógena de PGF_{2α} do endométrio, e é achado que ela pode induzir luteólise prematura e perda da prenhez. Para investigar isso, 12 camelos receberam 500 mg de antiprostaglandínico, flunixin meglumine, 15 minutos antes da transferência. Amostras de sangue foram colhidas em intervalos regulares. Os resultados mostraram que a estimulação da cervix causou uma leve liberação de PGF_{2α} que foi suprimido pelo flunixin meglumine. Entretanto, a luteólise prematura não ocorreu indicando que a quantidade de

PGF2 α liberada foi insuficiente para causar qualquer prejuízo na função luteal. Na verdade, as taxas de prenhez foram reduzidas nas receptoras tratadas com flunixin meglumine 16% (2/12) comparada com os animais controle 67%; (10/15). Isto pode ser resultado da supressão da motilidade uterina causada pelo flunixin meglumine (SKIDMORE et al., 2002; SKIDMORE & BILLAH, 2005).

Quarenta embriões de éguas da raça Mangalarga Marchador foram inovulados em igual número de receptoras da mesma raça. O primeiro grupo foi tratado com 1,1 mg/kg de flunixin meglumine e o segundo grupo não foi tratado. O grupo tratado apresentou 55% de taxa de prenhez (11/20), e o controle 75% (15/20) não existindo diferença entre eles. O tempo de sincronização das receptoras e a idade dos embriões no momento das inovulações foram similares. Houve diferença na qualidade dos embriões inovulados, pois as éguas não-gestantes do grupo controle receberam um número maior de embriões regulares (2/5) que as não-gestantes do grupo tratado (1/9). As concentrações plasmáticas de progesterona foram maiores nas receptoras gestantes do grupo tratado (CAIADO et al., 2005).

Vanderwall et al. (1993) demonstraram que embriões da espécie eqüina secretam PGE2 e a ação desta prostaglandina no transporte ovidutal de embriões eqüinos foi demonstrada por WEBER e WOODS (1993). Por inibir outras prostaglandinas, o flunixin meglumine poderia inibir também a síntese de prostaglandina E2 produzida pelo embrião eqüino, o que pode ter afetado o reconhecimento materno da gestação, justificando a menor taxa de prenhez do grupo tratado com esta droga (CAIADO et al., 2005).

Wilsher et al. (2006) realizaram um experimento com o intuito de utilizar receptoras que ovularam antes da doadora. Aplicou-se ácido meclofenâmico, um antiinflamatório não esteroide, da família dos fenamatos, a partir do nono dia após ovulação e por mais 7 dias após a TE. As receptoras foram divididas em grupo controle e tratadas. Dentro destes grupos existiam receptoras que ovularam 2, 3, 4 e 5 dias antes da doadora. Os grupos tratados com ácido meclofenâmico apresentaram taxas de prenhez significativamente maiores no dia 16 (+2 dias, 9/10; +3, 8/10; +4, 5/8 e +5, 3/8) enquanto as do grupo controle apresentaram taxas menores (+2, 8/10; +3, 2/10, +4; 5/8 e +5; 0/8).

Em estudo com camelos, animais tratados com ácido meclofenâmico (a partir do 7º dia após ovulação e por mais 8 dias após TE) reduziram o estreito período necessário de sincronia entre receptora e doadora . Embriões foram transferidos em receptoras D8, D10 e D12. As taxas de prenhez foram 80%, 60%, e 70%, respectivamente, quando comparada aos 10% nos animais do grupo controle, cujos embriões foram transferidos em receptoras não tratadas no dia 8 pos ovulação (SKIDMORE & BILLAH, 2005).

O efeito do tônus uterino e do tratamento com fenilbutazona sobre as taxas de prenhez em um programa comercial de TE em equinos foi avaliado. Receptoras foram divididas em 5 grupos: G1 éguas com tônus uterino ausente ou fraco, sem tratamento; G2 éguas com tônus uterino ausente ou fraco, receberam 1 dose única de 2g de fenilbutazona no momento da TE; G3 éguas com tônus uterino ausente ou fraco, receberam 3 doses de fenilbutazona de 2g, 3 vezes no dia da TE; G4 éguas com tônus uterino moderado a intenso, recendo 2 g de fenilbutazona no momento da TE e G5, éguas com tônus uterino moderado a intenso, sem tratamento. Todos os animais receberam um embrião. As taxas de prenhez encontradas foram 36,8; 35,7; 63,6; 82,6; 79,3%, respectivamente. Também observaram que houve correlação entre tensão uterina e taxa de gestação pois as taxas de gestação dos grupos 1 e 2, foram diferentes estatisticamente dos demais grupos. O G3 apresentou resultados comparáveis aos das éguas com bom tônus uterino, sugerindo efeito benéfico do tratamento na taxa de prenhez (DUARTE & VIEIRA, 2003).

3. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do ácido mefenâmico na capacidade de manutenção da função do corpo lúteo em receptoras que se encontravam no dia 10 do ciclo (D10), bem como verificar seus efeitos sobre as taxas de prenhez após a transferência de embrião.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local da Pesquisa

O experimento foi realizado durante os meses de setembro e outubro da estação reprodutiva 2009/10 e 2010/11, na Central de reprodução eqüina Genetic Jump, na Fazenda Haras Santa Maria, localizado no município de Itapetininga, SP.

4.2. Animais e Grupos Experimentais

Foi utilizado um total de quarenta éguas mestiças com idade entre 4 e 10 anos, escore corporal 3 e 4. Todos os animais estavam em plena atividade reprodutiva e não possuíam quaisquer anormalidades no trato reprodutivo que pudessem ser detectadas por exame de palpação, citologia uterina ou ultrassonografia transretal. Dois garanhões com fertilidade comprovada foram utilizados como doadores de sêmen. As éguas eram mantidas em sistema de confinamento com acesso a água, silagem de milho e sal mineral à vontade, tendo sua alimentação complementada com 2 kg de ração comercial peletizada própria para equinos uma vez ao dia. As éguas utilizadas como receptoras tiveram seu ciclo acompanhado através de palpação retal e ultrassonografia. Ao atingirem folículo de aproximadamente 35 mm e presença de edema endometrial mínimo grau 2 foram induzidas com 1,0mg de acetato de deslorelina I.M. Após confirmação da ovulação as receptoras eram distribuídas aleatoriamente em 3 grupos experimentais. O ácido mefenâmico utilizado neste experimento foi manipulado em forma de pasta, pela farmácia Powervet manipulação veterinária, SP- Brasil.

* Grupo 01: Controle (n=18)

Receptoras com dez dias de ovulação sem nenhum tratamento

* Grupo 02: Ácido mefenâmico D8 ao D16 (n=15)

Receptoras com dez dias de ovulação tratadas com 1g de ácido mefenâmico, via oral, do oitavo ao décimo sexto dia pós ovulação.

* Grupo 03: Ácido mefenâmico D10 ao D12 (n=15)

Receptoras com dez dias de ovulação tratadas com 1g de ácido mefenâmico, via oral, no dia da transferência e por mais dois dias

4.3. Delineamento Experimental

4.3.1. Produção dos embriões

Foi acompanhado o ciclo das éguas utilizadas como doadoras de embrião através de palpação retal e ultrassonografia. As éguas foram induzidas com 1,0 mg de acetato de deslorelina I.M. após atingirem folículo de aproximadamente 35 mm e presença de edema endometrial mínimo grau 2 (0-4). Vinte e quatro horas após a indução da ovulação foram inseminadas com 500x10⁶ de espermatozoides viáveis previamente diluídos em meio diluente à base de leite desnatado Botu-sêmen (Biotech Botucatu – Botucatu - SP). Oito dias após a confirmação da ovulação era realizada a lavagem uterina para recuperação dos embriões.

4.3.2. Colheita, manipulação e transferência dos embriões

Oito dias após a confirmação da ovulação da doadora (considerando-se D0 como o dia da ovulação) os embriões foram coletados, conforme procedimentos descritos por Squires et al. (2003). Foi utilizado a solução de ringer com lactato de sódio como meio de coleta (ALVARENGA et al., 1993).

Os embriões obtidos foram classificados em escala de 1 a 5 , de acordo com McKinnon & Squires (1988), em excelentes, bons, regulares, ruins e degenerados ou ovócitos com auxílio de microscópio esterioscópico com aumento de 10 a 35 vezes. Apenas embriões considerados excelentes e bons foram transferidos.

Após identificação do embrião, o mesmo passou para uma série de 10 lavagens (STRINGFELLOW, 1998) em meio de manutenção SYNGRO Holding® (Laboratório Bioniche-Canadá) para posteriormente ser envasado em palheta plástica 0,25 ml de volume em porções alternadas de solução de manutenção e ar. A palheta foi acoplada a uma bainha para TE (WTA-Brasil) juntamente com o aplicador metálico para TE. A técnica de transferência foi a transcervical e não-cirúrgica (RIERA e MCDONOUGH,1993, com modificações), com a deposição do embrião no interior do útero.

4.3.3. Palpação Retal e Exame Ultrassonográfico Uterino no dia da TE

O exame ultrassonográfico, foi realizado com auxílio de um ultra-som ALOKA 210, utilizando-se transdutor linear de frequência de 5 Mhz. As receptoras foram avaliadas pela palpação retal e ultrassonografia antes da transferência dos embriões, sendo classificadas como: 1) aceitável – presença de CL e tônus uterino e cervical variando de bom a excelente ou 2) não aceitável - pouca tonicidade uterina ou cervical (CARNEVALE et al; 2000).

Os embriões foram transferidos aleatoriamente para os 3 grupos de receptoras D10.

4.3.4. Colheita de amostra de sangue para dosagem de progesterona

Para determinação das concentrações séricas de progesterona, amostras de sangue foram colhidas por venopunção do oitavo ao décimo oitavo dia pós

ovulação a cada 24 horas em todos os grupos estudados. As amostras foram colhidas em tubos de ensaio, centrifugadas a 600 G por 10 minutos e o soro sanguíneo congelado a -20°C até a realização das análises pelo imunoensaio ADVIA Centaur Progesterone que recorre à tecnologia quimioluminescente direta.

4.3.5. Diagnóstico de Gestação

As receptoras foram examinadas através de ultrassonografia transretal seis dias após a transferência dos embriões para determinar a presença ou não de vesícula embrionária. Quando confirmado, o exame era repetido aos 30 dias.

4.4. Análise Estatística

Para análise das porcentagens de gestação e classificação uterina no dia da TE entre os grupos estudados foi utilizado o teste de Exato de Fisher. E para os valores obtidas da dosagem sérica de progesterona foi utilizado o teste de ANOVA one way seguido pelo teste de Tukey. Todas as estatísticas efetuadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

A porcentagem de receptoras que se tornaram prenhes nos diferentes grupos estudados não diferiu estatisticamente entre si. As taxas de prenhez apresentaram valores abaixo dos 50% em todos os grupos, conforme dados demonstrados na tabela 1.

TABELA 1- Número de Inovações e porcentagem de prenhez nas éguas receptoras dos grupos G1, G2 e G3.

Grupos	N° de Inovações e Prenhezes			(%) Prenhez
	Inovuladas	Gestantes	Não Gestantes	
G1	18	06	12	33,3
G2	15	06	09	40,0
G3	15	05	10	33,3

p>0,05

G1 – Controle, G2 – Ác. Mefenâmico do 8° ao 16° dia pós-ovulação, G3 – Ác. Mefenâmico do 10° ao 12° dia pós-ovulação.

Houve apenas uma morte embrionária no G3. As receptoras dos demais grupos permaneceram gestantes até os 30 dias. Não houve diferença na qualidade dos embriões inovulados, pois foram utilizados apenas os de grau 1 e 2, de acordo com McKinnon & Squires (1988). (Tabela 2)

TABELA 2- Taxa de gestação (%) aos 15 e 30 dias e porcentagem de morte embrionária nas éguas receptoras dos grupos G1, G2 e G3.

	Prenhez 15 dias	Prenhez 30 dias	Morte Embrionária
G1	06/18 (33,3%)	06/06 (100%)	0/06 (0%)
G2	06/15 (40,0%)	06/06 (100%)	0/06 (0%)
G3	05/15 (33,3%)	04/05 (80%)	1/05 (20%)

p>0,05

G1 – Controle, G2 – Ác. Mefenâmico do 8° ao 16° dia pós-ovulação, G3 – Ác. Mefenâmico do 10° ao 12° dia pós-ovulação.

Nas éguas gestantes não houve diferença entre os grupos G1, G2 e G3 para as concentrações de progesterona, estas permaneceram constantes em todos os grupos. (Tabela 3).

TABELA 3- Concentrações médias de progesterona (ng/ml) em receptoras que permaneceram gestantes nos grupos G1, G2 e G3.

	G1	G2	G3
D8	16,2 (\pm 2,0) ^{Aa}	18,2 (\pm 3,1) ^{Aab}	20,7 (\pm 4,3) ^{Aa}
D9	15,8 (\pm 2,9) ^{Aa}	17,8 (\pm 2,2) ^{Aab}	19,8 (\pm 3,8) ^{Aa}
D10	15,4 (\pm 4,0) ^{Aa}	18,6 (\pm 4,5) ^{Aa}	19,6 (\pm 4,2) ^{Aa}
D11	15,6 (\pm 6,0) ^{Aa}	16,5 (\pm 3,2) ^{Aabc}	17,9 (\pm 3,0) ^{Aab}
D12	12,9 (\pm 3,8) ^{Aa}	14,8 (\pm 2,1) ^{Aabc}	16,8 (\pm 3,3) ^{Aab}
D13	12,4 (\pm 3,3) ^{Aa}	15,2 (\pm 2,2) ^{Aabc}	15,3 (\pm 2,8) ^{Aabc}
D14	12,1 (\pm 2,1) ^{Aa}	14,3 (\pm 1,1) ^{Aabc}	14,1 (\pm 2,1) ^{Aabc}
D15	11,5 (\pm 1,9) ^{Aa}	13,8 (\pm 1,3) ^{Aabc}	12,1 (\pm 2,5) ^{Abc}
D16	10,7 (\pm 4,6) ^{Aa}	13,2 (\pm 2,4) ^{Abc}	9,4 (\pm 2,4) ^{Ac}
D17	10,2 (\pm 5,6) ^{Aa}	12,0 (\pm 2,8) ^{Ac}	9,3 (\pm 2,5) ^{Ac}
D18	11,8 (\pm 2,6) ^{Aa}	11,3 (\pm 3,0) ^{Ac}	8,7 (\pm 2,8) ^{Ac}

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

^{AB} Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

G1 – Controle, G2 – Ác. Mefenâmico do 8° ao 16° dia pós-ovulação, G3 – Ác. Mefenâmico do 10° ao 12° dia pós-ovulação.

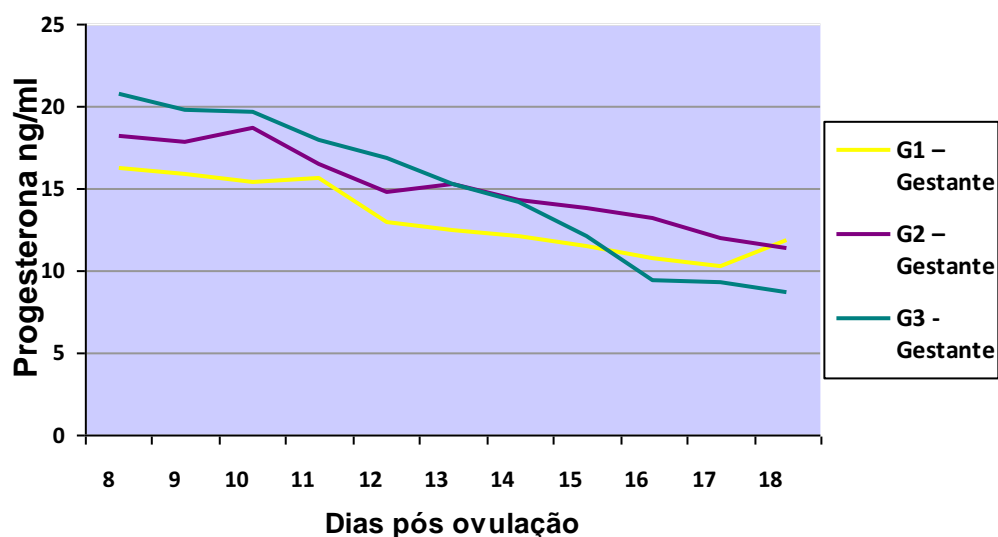


FIGURA 1 - Média da Concentração de Progesterona (ng/ml) nas receptoras gestantes. G1 – Controle, G2 – Ác. Mefenâmico do 8° ao 16° dia pós-ovulação, G3 – Ác. Mefenâmico do 10° ao 12° dia pós-ovulação.

Nas éguas não gestantes, todos os grupos apresentaram queda semelhante na concentração média de progesterona, conforme demonstrado na Tabela 4.

TABELA 4- Concentrações médias de progesterona (ng/ml) em receptoras não gestantes nos grupos G1, G2 e G3.

	G1	G2	G3
D8	15,2 (\pm 3,8) ^{Aa}	15,9 (\pm 2,9) ^{Aab}	14,9 (\pm 3,4) ^{Aa}
D9	13,6 (4,1) ^{Aab}	16,5 (\pm 3,2) ^{Aab}	14,5 (\pm 2,9) ^{Aa}
D10	13,7 (\pm 4,9) ^{Aab}	16,7 (\pm 5,1) ^{Aa}	13,9 (\pm 2,8) ^{Aa}
D11	9,9 (\pm 5,2) ^{Abc}	12,7 (\pm 4,3) ^{Ab}	9,3 (\pm 4,1) ^{Ab}
D12	7,3 (\pm 6,2) ^{Acd}	4,6 (\pm 1,9) ^{Ac}	5,4 (\pm 2,9) ^{Ac}
D13	3,4 (\pm 2,6) ^{Ade}	2,9 (\pm 1,2) ^{Acd}	2,4 (\pm 0,9) ^{Acd}
D14	1,1 (\pm 2,0) ^{Ae}	1,6 (\pm 0,5) ^{Acd}	1,0 (\pm 0,2) ^{Ad}
D15	0,8 (\pm 0,3) ^{Ae}	0,6 (\pm 0,1) ^{Ad}	0,7 (\pm 0,2) ^{Ad}
D16	0,6 (\pm 0,1) ^{Ae}	0,3 (\pm 0,1) ^{Bd}	0,3 (\pm 0,2) ^{Bd}
D17	0,5 (\pm 0,2) ^{Ae}	0,2 (\pm 0,1) ^{Bd}	0,3 (\pm 0,2) ^{Bd}
D18	0,3 (\pm 0,1) ^{Ae}	0,4 (\pm 0,1) ^{Ad}	0,3 (\pm 0,1) ^{Ad}

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

^{AB} Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

G1 – Controle, G2 – Ác. Mefenâmico do 8° ao 16° dia pós-ovulação, G3 – Ác. Mefenâmico do 10° ao 12° dia pós-ovulação.

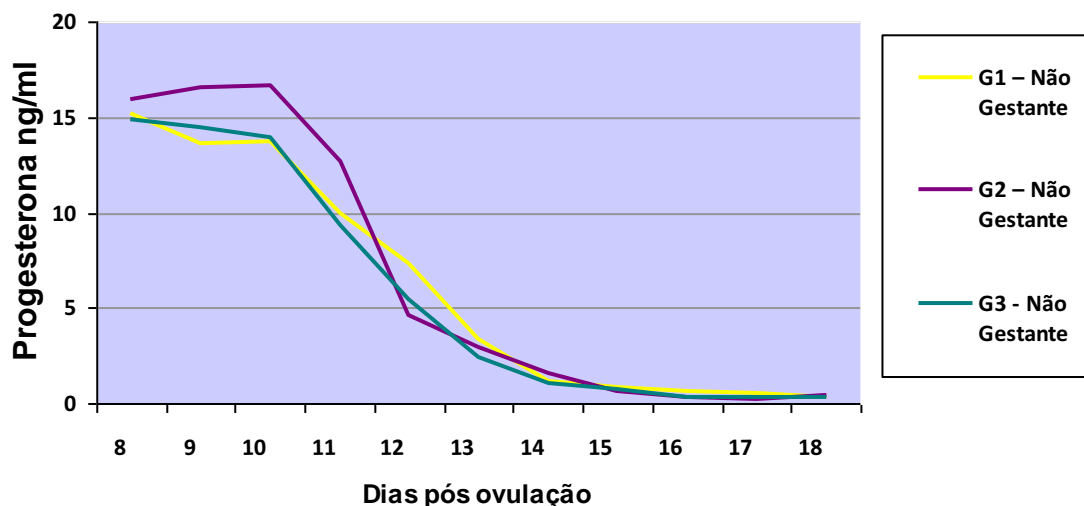


FIGURA 2- Média da Concentração de Progesterona (ng/ml) nas receptoras não gestantes. G1 – Controle, G2 – Ác. Mefenâmico do 8° ao 16° dia pós-ovulação, G3 – Ác. Mefenâmico do 10° ao 12° dia pós-ovulação

Baseando no dia em que as éguas não gestantes apresentaram concentrações menores que 1 ng/ml de progesterona obteve-se o tempo médio da ocorrência de luteólise. No grupo G1 (controle) o tempo médio foi de 14,3 dias pós ovulação. Nos grupos G2 e G3 foi de 14,5 e 14, 2 dias, respectivamente (tabela 5).

TABELA 5- Tempo de ocorrência da concentração sérica de progesterona <1 ng/ml nas receptoras não gestantes dos grupos G1, G2 e G3.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
P4<1 (dias pós ovulação)	14,3	14,5	14,2

(p>0,05)

Foi avaliada a influência do tônus uterino no momento da TE sobre as taxas de gestação nas receptoras de embrião. As éguas dos grupos G1, G2 e G3 classificadas como aceitáveis (tônus uterino e cervical variando de bom a excelente) apresentaram maior taxa de gestação em relação as éguas classificadas como marginalmente aceitáveis (pouca tonicidade uterina e cervical). As relações entre as classificações uterinas e taxas de prenhez estão demonstradas na tabela 6.

TABELA 6- Classificação do tônus uterino e cervical no dia da TE em relação a taxa de prenhez (%) nas receptoras dos grupos G1, G2 e G3.

Grupos	Tônus uterino e cervical	
	<i>Não aceitável</i>	<i>Aceitável</i>
G1	10/0 (0%) ^{Aa}	6/8 (75%) ^{Ba}
G2	8/0 (0%) ^{Aa}	6/7 (85,7%) ^{Ba}
G3	8/0 (0%) ^{Aa}	5/7 (71,4%) ^{Ba}

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

^{AB} Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

G1 – Controle, G2 – Ác. Mefenâmico do 8° ao 16° dia pós-ovulação, G3 – Ác. Mefenâmico do 10° ao 12° dia pós-ovulação.

6. DISCUSSÃO

Na transferência de embrião éguas receptoras que ovulam depois da doadora geralmente são melhores candidatas do que aquelas que ovulam antes, particularmente se a ovulação tiver ocorrido 2 dias antes (MCKINNON e VOSS, 1992). O uso de receptoras em condições naturais antes de quatro dias após a ovulação não tem sido recomendado na literatura, observando-se que, a partir do 9º dia, a taxa de prenhez piora bastante após a transferência, inviabilizando a utilização a partir deste dia (CAIADO et al., 2007). Diferindo desses resultados, Alonso (2007) não encontrou diferença nas taxas de prenhez de éguas receptoras de embrião entre os dias 3 e 8 do ciclo.

McKinnon e Squires (1988) transferiram embriões em receptoras cujos corpos lúteos encontravam-se entre os dias 5 e 10 após a ovulação, não encontrando diferenças significativas ($p > 0,05$) nas taxas de prenhez. Por outro lado, Alvarenga (1989) menciona tendência de melhora, embora não-significativa, nos índices de prenhez quando a idade do corpo lúteo decresce, ou seja, aproxima-se do dia da ovulação.

No presente estudo, embriões foram transferidos apenas em éguas receptoras ovuladas 2 dias antes (D10) da doadora. Verificou-se que com a utilização do ácido mefenâmico nas receptoras do 8º ao 16º dia após ovulação (G2) obteve-se taxa de prenhez de 40,0% (6/15). Nos animais tratados do 10º ao 12º dia pós ovulação (G3) e nas éguas do grupo controle (G1) as taxas de gestação foram 33,3% (6/18) e 33,3% (5/15), respectivamente. Resultados semelhantes foram observados em experimento realizado por Koblischke et al. (2008) onde a coleta embrionária foi maior nas receptoras ovuladas no mesmo dia ou dois dias depois da doadora independente de terem sido ou não tratadas com o ácido meclofenâmico ou o flunixin meglumine.

No trabalho de Pool et al. (1987) receptoras que ovularam 2 a 3 dias antes da doadora falharam em manter a gestação mesmo sendo tratadas com progestágenos. Valores diferentes, como relatado por Wilsher et al. (2006); apresentaram taxas de prenhez de 81% (13/16) em animais que ovularam 2 dias antes (D10) da doadora e que foram tratados com ácido meclofenâmico do nono dia pós ovulação até 7 dias após a transferência do embrião.

Em estudo realizado com camelos, animais tratados com ácido meclofenâmico (a partir do 7º dia após ovulação e por mais 8 dias após T.E) apresentaram taxas de prenhez de 80%, 60% e 70% transferidos em receptoras D8, D10 e D12, respectivamente. Já nos animais do grupo controle o percentual de gestação foi de apenas 10%, cujos embriões foram transferidos em receptoras não tratadas no dia 8 pós ovulação (SKIDMORE e BILLAH, 2005).

Analisando os dados obtidos nas éguas dos 3 grupos pode-se observar que a taxa de gestação foi baixa. Ginther (1983) sugere que a fixação embrionária ocorre pela interação do aumento do tônus uterino, aumento do tamanho da vesícula embrionária e um impedimento físico para mais movimentos causados pela brusca curvatura ou flexura do corno uterino neste ponto.

Nos 3 grupos deste experimento as concentrações de progesterona permaneceram praticamente constantes nas éguas gestantes. Nas éguas não gestantes a concentração diminuiu gradativamente, principalmente a partir do 12º dia pós ovulação.

Houve apenas uma morte embrionária no G3. As receptoras dos demais grupos permaneceram gestantes até os 30 dias. A perda embrionária tem sido relacionada à baixa concentração de progesterona no início da prenhez (Douglas et al. 1985; Ginther, 1985). Não houve diferença na qualidade dos embriões inovulados, pois foram utilizados apenas os de grau 1 e 2, de acordo com McKinnon e Squires (1988).

Resultados diferentes em relação à progesterona foram encontrados por Caiado et al. (2005) com o uso de outros antiinflamatórios como o flunixin meglumine; cujas concentrações plasmáticas de P4 foram maiores nas receptoras tratadas. Contudo, a taxa de prenhez foi de 55% (11/20) e 75% (15/20) em éguas tratadas e não tratadas, respectivamente.

Wilsher et al. (2010) trabalhando com embriões D10 e os transferindo em uma janela de sincronia entre -4 (D14) e +9 (D1) relataram que a quantidade de progesterona produzida pela receptora com relação ao seu tempo de ovulação não pareceu ser um pré requisito para a sobrevivência do embrião. Eles observaram que houve influência no desenvolvimento embrionário quando não estão em sincronia, já que retardou o crescimento e a formação do alantóide .E, que independente da sincronia o tempo de fixação embrionária foi de 17 dias.

Vanderwall et al. (1993) demonstraram que embriões da espécie equina secretam prostaglandina E2 (PGE2) e a ação da PGE2 no transporte ovidutal de embriões eqüinos foi demonstrada por Woods et al. (1991). Por inibir outras prostaglandinas, o flunixin meglumine poderia inibir também a síntese de PG E2 produzida pelo embrião equino, ocorrendo uma diminuição das contrações uterinas e conseqüentemente inibição da mobilidade embrionária o que pode ter afetado o reconhecimento materno da gestação, justificando a menor taxa de prenhez do grupo tratado com esta droga (CAIADO et al., 2005).

Skidmore et al. (2002) também observaram uma menor taxa de gestação em animais tratados com o flunixin meglumine. Foi sugerido que a manipulação e distensão da vagina e cervix pudessem estimular a secreção endógena de PGF2 α do endométrio, o que poderia induzir luteólise prematura e perda da prenhez. Doze camelos receberam 500 mg de antiprostaglandínico, flunixin meglumine, 15 minutos antes da transferência. Amostras de sangue

foram colhidas em intervalos regulares. Os resultados mostraram que a estimulação da cervix causou uma leve liberação de PGF2 α que foi suprimido pelo flunixin meglumine. Entretanto, a luteólise prematura não ocorreu indicando que a quantidade de PGF2 α liberada foi insuficiente para causar qualquer prejuízo na função luteal. As receptoras tratadas obtiveram uma taxa de gestação de 16% (2/12) e os animais controle de 67% (10/15).

Os fenamatos impedem que prostaglandinas já formadas se liguem a receptores de PGE2 (REES et al., 1988). Entretanto, Koblieschke et al. (2008) observaram que o ácido meclofenâmico teve um menor efeito sobre a expressão do mRNA para PGES, em relação ao flunixin meglumine. O PGE, além de seu papel na inflamação, está envolvido no reconhecimento maternal da gestação e estimula a mobilidade intrauterina do concepto equino entre 9 a 16 dias pós ovulação (GINTHER, 1983; STOUT e ALLEN, 2002). Segundo Mcdowell et al. (1988) o tratamento de éguas com flunixin meglumine durante a fase de reconhecimento materno da gestação bloqueou a mobilidade embrionária neste período.

Como não houve seleção de receptora baseado nas características uterinas no momento da TE, as taxas de prenhez das receptoras dos diferentes grupos podem ter sofrido influência. Em experimento realizado por Carnevale et al. (2000) éguas que foram classificadas como marginais apresentaram taxas de prenhez estatisticamente inferiores às das éguas classificadas como aceitáveis (70,3% versus 56,2%).

O uso deste antiprostaglandínico não interferiu significativamente com os níveis séricos de progesterona. Além disso, foi observado também que não houve relação entre taxas de prenhez e níveis de progesterona. Em trabalho realizado por Duarte e Vieira (2003) também foi demonstrado correlação entre tensão uterina e taxa de gestação, onde éguas com tônus uterino moderado a intenso apresentaram taxas de prenhez de 79,3%, já os animais com tônus uterino ausente ou fraco os índices de prenhez foram 36,8%.

No presente trabalho o uso do antiinflamatório ácido mefenâmico também não foi capaz de aumentar a longevidade ou inibir a ocorrência de lise do corpo lúteo. De acordo com esses resultados, Wilsher et al. (2004) também relatam que a luteólise não pôde ser evitada com o ácido meclofenâmico nas éguas

que não ficaram gestantes. O tempo médio (dias) do início do estro, ou seja, níveis de progesterona abaixo de 1ng/ml (VIVO et al. 1986; OBA et al. 1992) foi de 14,5 e 14,2 dias nos grupos 2 e 3. No grupo 1 (controle) o tempo médio foi de 14,3 dias.

Neste estudo as receptoras dos grupos 1, 2 e 3 que apresentaram tônus uterino e cervical de bom a excelente no dia da te, obtiveram taxas de gestação de 75%, 85,7% e 71,4%, respectivamente. Segundo Carnevale et al. (2000), o tônus uterino reduzido pode indicar um ambiente uterino não compatível com o crescimento e desenvolvimento embrionário. Éguas com tônus uterino ruim a pobre podem ter concentrações de progesterona circulantes mais baixas, o que poderia afetar o tônus uterino e cervical (GINTHER, 1992).

Verificou-se também neste trabalho que o índice de gestação foi significativamente maior nas éguas que apresentaram tônus uterino e cervical de bom a excelente no momento da inovulação do embrião, independente de ter recebido ou não o tratamento com ácido mefenâmico.

Corroborando com esses resultados, Alonso (2007) também reportaram em seu experimento maior taxa de prenhez em éguas com tônus uterino 1 no dia da TE. E as receptoras com tônus uterino 2 apresentaram taxa de prenhez estatisticamente maior em relação às éguas com tônus uterino 3. É citado também a provável relação entre a concentração de estrógeno no estro sobre a expressão de receptores de progesterona no endométrio, os quais afetariam as características uterinas no dia da TE.

A utilização de receptoras D10 seria uma alternativa na transferência de embrião desde que as mesmas apresentem adequado tônus uterino no momento da te.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente experimento permitem concluir que o ácido mefenâmico não melhorou as taxas de prenhez em receptoras D10, não interferiu na concentração sérica de progesterona e nem no tônus uterino.

8. REFERÊNCIAS

ALLEN, W.R. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. **Reprod Dom Anim.** 36, p.121-131, 2001.

ALVARENGA, M. A. **Efeito de alguns fatores sobre índices de coleta e transferência de embriões em eqüinos.** 1989. 66 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Médica) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Campus de Botucatu.

ALVARENGA, M.A.; ALVARENGA, F.C.L.; MEIRA, C. Modifications in the technique used to recover equine embryos. **Equine Vet. J.**, suppl.15, p.111-12, 1993.

ALONSO, M.A.; FLEURY, P.D.C.; ALVARENGA, M.A. Utilização de éguas receptoras de embrião três dias (D3) após a ovulação. Em: XI CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 29, 2010 São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: SP, p.327-28, 2010.

ALONSO, M.A. **Efeito das características uterinas e dia do ciclo na taxa de prenhez e níveis séricos de progesterona em éguas candidatas à receptora de embrião.** 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, 2007.

ARRUDA, R.P. Manejo reprodutivo das fêmeas eqüinas. Em: Semana de Zootecnia, 13. 1990, Pirassununga. In: REPRODUÇÃO E MELHORAMENTO ANIMAL, 1990, Campinas. **Anais...**Campinas: Fundação Cargill, 1990. 126 p.

ARRUDA, R.P. **Efeitos da idade, desenvolvimento folicular, tamanho e morfoecogenicidade luteínica, níveis de progesterona e técnicas de inoculação, sobre os índices de gestação em receptoras de embriões eqüinos.** 1995. 112 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e

Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

ARRUDA, R.P.; VISINTIN, J.A.; FLEURY, J.J.; GARCIA, A.R.; MADUREIRA, E.H.; CELEGHINI, E.C.C.; NEVES NETO, J.R. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões eqüinos? **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci**, v.38, n.5, p.233-239, 2001.

ATLI, M.O.; KURAR, E.; KAYIS, S.A.; ASLAN, S.; SEMACAN, A.; CELIK, A.; GUZELOGLU, A. Evaluation of genes involved in prostaglandin action in equine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, 122, p.124-132, 2010

BALL, B.A.; LITTLE, T.V.; WEBER, J.A.; WOODS, G.L.; Survival of day-4 embryos from young, normal mares and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares. **J Reprod Fertil** 1989;85:187- 94.

BARNES, F.L. The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. **Theriogenology**, v. 53, p. 649-658, 2000.

BATTYE, K.M.; FAIRCLOUGH, R.J.; CAMERON, A.W.N.; TROUNSON, A.O. Evidence for prostaglandin involvement in early luteal regression of the superovulated nanny goat (*Capra hircus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, n. 2, p. 425-430, nov. 1988.

BERGFELT, D.R.; ADAMS, G.P. Ovulation and corpus luteum development. In: SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; MCKINNON, A.O. **Current Therapy in Equine Reproduction**. Saunders: Philadelphia, cap.1, p.1-13, 2007.

BERTAN, M. C.; BINELLI, M.; MADUREIRA, H. E.; TRALDI, S. A. Mecanismos Endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci**, São Paulo, v. 43, n.6, p. 824-840, 2006.

BERRY, P. A. and H. O. J. COLLIER. Bronchoconstrictor action and antagonism of a slow reacting substance from anaphylaxis of guinea-pig isolated lung. **Br. J. Pharmac.**, v.23, p.201-216, 1964.

CAIADO, J.R.C.; FONSECA, F. A.; SILVA, J.F.S.; CAIADO, J.C.C.; FONTES, R.S. Aplicação do flunixin meglumine antes da transferência não cirúrgica de embriões em éguas da raça Mangalarga Marchador. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 12, n. 1/3, p. 11-15, jan./dez. 2005.

CAIADO, J.R.C.; FONSECA, F.A.; SILVA, J.F.S.; FONTES, R.S. Tratamento de éguas receptoras de embriões visando sua utilização no segundo dia pós ovulação. **R. Bras. Zootec.**, v.36, n.2, p.360-368, 2007.

CARNEVALE, E.M.; RAMIREZ, R.J.; SQUIRES, E.L.; ALVARENGA, M.A.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death equine embryo transfer. **Theriogenology**, v.54, p.965-979, 2000.

CASTRO, R.P.R. **Influência de aspectos reprodutivos e hormonais de éguas doadoras e receptoras de embriões da raça Campolina sobre a taxa de gestação e morte embrionária.** 2005. 70p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Veterinária/ Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

COLLIER, H. O. J. and P. G. SHORLEY. Antagonism of mefenamic and flufenamic acids of the bronchoconstrictor action of kinins in the guineapig. **Br. J. Pharmac.**,v. 20, p.345-351, 1963.

DANET- DESNOYERS, G.; WETZELS,C.; THATCHER,W.W. Natural and recombinant interferon-t regulate basal and oxytocin-induced secretion og prostaglandins F2 apha and E2 by epythelial cells and estromal cells in the endometrium. **Reproduction and Fertility Development**, v.6, p.193-202, 1994.

DOUGLAS RH.; BURNS PJ.; HERSHMAN, L. Physiological and commercial parameters for producing progeny from subfertile mares by embryo transfer. **Equine Veterinary Journal**. 1985; 3: 111-114.

DUARTE, M.B.; VIEIRA, R.C. Efeito da fenilbutazona sobre as taxas de prenhez em éguas receptoras de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.322, 2003.

DUBOIS, R.N.; ABRANSON, S., CROFFORD, L., et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **Faseb J**, v.12, p. 1063-1073, 1998.

FERREIRA, J.B.P. **Características ultra-sonográficas e concentração de progesterona na ocorrência de morte embrionária em éguas (Equus caballus) da raça Campolina**. 2000. 81P. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Veterinária/ Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2000.

FLEURY, J.J.; PINTO, A.J.; MARQUES, A.; LIMA, C.J.; ARRUDA, J.P. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em eqüinos da raça mangalarga. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** 38, p.29-33, 2001.

FLEURY, P.D.C.; ALONSO, M.A.; BALIEIRO, J.C.C. Avaliação da receptora: efeito de características uterinas e tempo de ovulação. In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Araxá. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34 (supl. 1), p.502, 2006.

FRIZZO, A. As Prostaglandinas na Reprodução. Seminário apresentado na disciplina de Endocrinologia da Reprodução no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002. 26p. Disponível em:
<http://www6.ufrgs.br/favet/lacvet/restrito/pdf/PG_reprod.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2010.

GAIVÃO, M.M.F.; STOUT, T.A.E. Maternal recognition of pregnancy in the mare- a mini review. **Revista Lusófona Ciência e Medicina Veterinária.**, p.5-9, 2007.

GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L, TORRES, C.A.A.; GINTHER ,O. J. Effect of PGE2 on uterine contractility and tone in mares. **Theriogenology** 50, p. 989-999, 1998.

GILBERT, D.E.; COONROD, S.A.; WRITING, C.J.; PASHEN, R.L. Comparison of a progesterone intravaginal device with flunixin meglumin for reducing the effects of corpora lutea regression in the goat. **Theriogenology**, v.33, p. 230, 1990.

GINTHER, O.J. Fixation and orientation of the early equine conceptus. **Theriogenology** , 19:613–623, 1983.

GINTHER, O.J. Dinamic physical interaction between the equine embryo and uterus. **Equine Vet. J.**,sup. 3, p. 41 - 47, 1985.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied Aspects**, 2ed. Cross Plains, Equiservices: Wisconsin, p.377, 1992.

HANDLER, J.; HOFFMAN, D.; WEBER, F.; SCHAMS,D.; AURICH, C. Oxytocin does not contribute to the effects of cervical dilation on progesterone secretion and embryonic development in mares. **Theriogenology**, v.66, p.1397-1404, 2006.

HANSEL, W.; BLAIR, R.M. Bovine corpus luteum: a historic overview and implications for future research. **Theriogenology**, v.45, p.1267-1294, 1996.

HAYES, K.E.N.; GINTHER, O.J. Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. **Theriogenology**, v.25, n.4, p.581-590, 1986.

JASKO, D.J. Comparison of pregnancy rates following nonsurgical transfer of day 8 embryos using various transfer devices. **Theriogenology**, v.58, p.713-715, 2002.

KASTELIC, J. P.; ADAMS, G.P.; GINTHER, O.J. Role of progesterone in mobility, fixation, orientation, and survival of the equine embryonic vesicle. **Theriogenology** 27: p.655-663, 1987.

KOBLISCHKE, P., KINDAHL, H., BUDIK, S., AURICH, J., PALM, F., WALTER, I., KOLODZIEJEK, J. NOWOTNY, N., HOPPEN, H.O., AURICH, C. Embryo transfer induces a subclinical endometritis in recipient mares which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. **Theriogenology**, v.70, p.1147-1158, 2008.

MCDOWELL, K.J.; SHARP, D.C.; GRUBAUGH, W.; THATCHER, W.W.; WILCOX, C.J. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. **Biol Reprod** 39, p. 340-348, 1988.

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Morphologic assessment of the equine embryo. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, v. 192, n. 3, p. 401-406, 1988.

McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. Equine Reproduction. Pennsylvania, Lea & Febigen, cap. 19, p.179-185, 1992.

NAGY, P.; HUSZENICZA, G.; REICZIGEL, J.; JUHÁSZ, J.; KULCSÁR, M.; ABAVÁRY, K. & GUILLAUME, D. Factors affecting plasma progesterone concentration and the retrospective determination of time of ovulation in cyclic mares. **Theriogenology**, v.61, p.203-214, 2004.

NETT, T. M.; PICKETT, B. W.; SEIDEL, G. E. J.; VOSS, J. L. Levels of luteinizing hormone and progesterone during the estrus cycle and early pregnancy in mares. **Biology of Reproduction**, v.14, p.412-415, 1976.

OBA, E.; MOREIRA, A. F.; MAMPRIM, M. J. Progesterone and LH serum concentration in adult mares during oestrus. In: **INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION**, 12., Netherlands. Free communications. Hague, p. 1900-1902, 1992.

ODENSVIK, K.H. Pharmacokinetics of flunixin and its effect on prostaglandin F₂ α metabolite concentrations after oral and intravenous administration in heifers. **Journal Veterinary Pharmacology Therapeutic.**, v. 18, p. 254-259, 1995.

PATE, J.L. Cellular componentes involved in luteolysis. **J. Anim. Sci.**, v. 72,p. 1884-1890, 1994.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic evaluation of the Corpus luteum of the mare. **Theriogenology**, v. 23, p.795-806, 1985.

POOL, K.F., WILSON, J.M., WEBB, G.W., KRAEMER, D.C., POTTER, G.D. and EVANS, J.W. Exogenous hormone regimes to utilise successfully mares in dioestrus (Days 2 to 14 after ovulation) as embryo transfer recipients. **J. Reprod. Fert. Suppl.**v. 35, p.429- 432, 1987.

REES MCP,; CANETE-SOLER R,; BERNAL AL,; TURNBULL AC. Effect of fenamates on prostaglandin e receptor binding. **THE LANCET** SEP 3. 1988; 541: 542.

RIERA, F.L., MCDONOUGH, J. Commercial embryo transfer in polo ponies in **Argentina. Equine Vet. J.**, (Suppl 15), p.116-119, 1993.

ROCHA FILHO, A.N.; PESSOA, M.A.; GIOSO, M.M.; ALVARENGA, M.A. Uso de progesterona de longa ação na preparação de éguas não ciclantes como receptoras de embrião. In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Barra Bonita, **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.89, 2004.

SHARP, D.C.; MCDOWELL, K.J.; WEITHENAUER, J.; THATCHER, W.W. The continuum of events leading to maternal recognition of pregnancy in mares. **J Reprod Fertil Suppl** 37, p. 101-107, 1989.

SKIDMORE, J.A.; BILLAH, M.; ALLEN, W.R. Investigation of factors affecting pregnancy rate after embryo transfer in dromedary camels. **Reprod Fertil Dev** 14: p.109-16, 2002.

SKIDMORE, J.A.; BILLAH, M. Embryo transfer in the dromedary camel using asynchronous, meclofenamic acid- treated recipients. **Reproduction, Fertility and development**, v.17, p.417-21, 2005.

SPENCER, T.E.; BURGHART, R.C.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Anim Reprod Sci** 82-83: p.537-550, 2004.

SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M.; McCUE, P. M., BRUEMMER, J.E. Embryo Technologies in the horse. **Theriogenology**, v.59, p.151-170, 2003.

SQUIRES, E.L. Management of donors and recipients. In: **Congresso Multisala- società italianan veterinari per equini**, 7, bologna, 2006.

STOUT, T.A.E.; ALLEN, W.R. Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. **Journals of Reproduction and Fertility** 121, p. 771-775, 2001.

STOUT, T.A.E.; ALLEN, W.R. Prostaglandin E2 and F2_α production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. **Journals of Reproduction and Fertility** 123, p.261-268, 2002.

STRINGFELLOW, D.A. Recomendações para o manuseio sanitário de embriões obtidos In Vivo. In: Stringfellow, D.A., Seidel, S.M (Ed. Português) **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3ª ed., p.83-88, 1998.

TASAKA, A.C. Antiinflamatórios não esteroidais. In: SPINOSA, S. H.; GÓRNIK, L.S.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.21, p.212-226, 1999.

TOWNSON, D.H.; PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Characterization of plasma progesterone concentrations for two distinct luteal morphologies in mares. **Theriogenology**, v. 32, n. 2, p. 197-204, 1989.

TRALDI, S.A ;VISINTIN, V. A; MIZUTA, K.; DELA LIBERA, A M.P.; RODRIGUES,P.H.M. Eficácia de tratamentos antiprostaglandinico na prevenção da regressão prematura do corpo lúteo em caprinos. **Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRGS, Supl.**, v.24, p. 220, 1996.

VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L.; WEBER, J. ^a; LICHTENWALNER, A. B. PGE 2 secretion by the conceptus and binding by non- pregnant endometrium in the horse. **Equine Vet. J. Suppl.**, n. 15, p. 24- 27,1993.

VANDERWALL, D. Current equine embryo transfer techniques. In: RECENT ADVANCES IN EQUINE REPRODUCTION. **International Veterinary Information Service**, Ithaca NY, 2000; A0204.0400.

VANDERWALL, D.K.; SQUIRES, E.L.; BRINSKO, S.P.; McCUE, P.M. Diagnosis and management of abnormal embryonic development characterized by formation of an embryonic vesicle without an embryo in mares. **J Am Vet Med Assoc.**, 217, p.58-63, 2000.

VANDERWALL, D.K. Early embryonic loss in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, n.11, p.691-702, 2008.

VIVO, R.; SANTISTEBAN, R.; TOVAR, P.; CASTEJON, M. F. Valores de progesterona en plasma de yeguas españolas y arabs durante el ciclo reproductor. **Archivos de Zootecnia**, Madrid, v. 35, n. 131, p. 59-67, 1986.

WATSON, E.D.; BJORKSTEIN, T.S.; BUCKINGHAM, J.; NIKOLAKOPOULOS, E. Immunolocalisation of oxytocin in the uterus of the mare. **J Reprod Fert Abstract Series** 20: p.31, 1997.

WILSHER, S.; KOLLING, M.; ALLEN, W.R. Meclofenamic acid extends donor recipient asynchrony in equine embryo transfer. **Equine Vet. J.**, v.38, p.428-432, 2006.

WILSHER, S.; KOLLING, M.; ALLEN, W.R. The use of meclufenamic acid to extend donor-recipient asynchrony in equine embryo transfer. **Havemeyer Foundation Monograph series n.16**, p.8-9, 2004.

WILSHER, S.; CLUTON-BROCK, A.; ALLEN, W.R. Successful transfer of day 10 horse embryos: influence of donor-recipient asynchrony on embryo development. **Reproduction**, 139: p.575-585, 2010.

WINDSOR, C. V., J. WAX, L. SCOTTI, R. A. SCHERRER, R. A. JONES and T. W. SHORT. Anti-inflammatory, antipyretic and antinociceptive properties of N-(2,3-xylyl) anthranilic acid(mefenamic acid). **J. Pharm. exp. Ther.**, v.138, p. 405-413,1962.

WOODS, G.L.; WEBER, J. A.; VANDERWALL, D. K.; FREEMAN ,D.A. Selective oviductal transport and fertilization rate of equine embryos. **Proceedings AAEP** 37, p.197–201, 1991.

ZAVY, M.T. An investigation of the uterine luminal environment of non-pregnant and pregnant pony mares. **J Reprod Fert Suppl** 27, p.403-11, 1979.

REVISTA “VETERINÁRIA E ZOOTECNIA”
NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS
INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- Artigos Científicos

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. Página de rosto, com:

- Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;

- Nomes completos dos autores, em que somente a primeira letra de cada nome deve ser maiúscula, do lado direito da página. Digitá-los, separados um por linha, com chamadas de rodapé numeradas e em sobrescrito, que indicarão o cargo e o endereço profissional dos autores, seguidos da instituição onde o trabalho foi desenvolvido ou às quais estão vinculados;

- Nome, endereço, telefone, fax e correio eletrônico, para correspondência;

- Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

2. Página com resumo, abstract e resumen

- Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço 1,5, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen devem ser tradução fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado, deverá conter o resumo em português, inglês e espanhol.

- Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, key words, e palabras-clave que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

Introdução: Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

Material e Métodos: Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

Resultados: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a forma de tabelas, em folha à parte, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/WBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a forma de figuras, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura. Devem ser identificadas em folha à parte, onde deve constar o título do artigo. Fotografias podem ser em preto e branco ou coloridas, identificadas com o(s) nome(s) do(s) autor(es) no verso. No caso de desenhos originais, a impressão deve ser em papel adequado, de qualidade.

Discussão: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

Conclusões: É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

Referências: Devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver (<http://www.icmje.org/>).

Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, em três vias (uma original e duas cópias) impressas, formato A4

(21,0 x 29,7 cm), em espaço duplo, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Deverão também apresentar numeração nas linhas, reiniciando a contagem a cada nova página. Ilustrações e legendas devem ser apresentadas em folhas separadas. Encaminhar cópia em disquete 3 ½” de alta densidade ou CD, identificado com título do artigo e nome dos autores. Nas duas cópias deve(m) ser omitido(s) o(s) nome(s) do(s) autor(es), o local onde se realizou o trabalho, bem como o rodapé. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.

- Artigos de Revisão Bibliográfica

Os artigos de revisão bibliográfica serão publicados nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola, quando o autor apresentar contribuição científica, relevante na área específica do assunto abordado, a convite dos editores.

Deverão conter: Título (português, inglês e espanhol), resumo com palavras-chave, abstract com key words e resumen com palabras-claves, introdução, desenvolvimento do assunto, conclusão e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas e 60 referências.

- Relato de Caso

Não devem ser estruturados, como os artigos. Devem apresentar o título em português, em inglês e espanhol, resumo com palavras-chave, abstract com key words, resumen com palabras-claves e referências. Devem conter no máximo cinco páginas, três tabelas ou figuras e 15 referências.

- Comunicações Curtas

São relatos contendo dados inéditos e relevantes de estudos originais, como, por exemplo, resultados preliminares de uma pesquisa. Devem ser apresentadas com, no máximo, cinco páginas, uma tabela e 10 referências. A estrutura deve respeitar as normas para relatos de caso.

- Referências e Citações

As referências devem ser numeradas consecutivamente e listadas na ordem em que são mencionadas no texto. As referências devem ser identificadas no texto, nas tabelas e legendas com números arábicos, entre parênteses, seguindo a mesma sequência. Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>.

Exemplos

Citações

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa(1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram.

O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51).

O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

Referências

Indique somente até seis autores. Em caso de mais autores, usar et al. após o sexto autor.

1. Artigo de revista

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

2. Organização como autor

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

3. Livro

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

4. Capítulo de livro

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. 2a ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

Mendes AA, Saldanha ESPB. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: Mendes AA, Naas IA, Macari M. *Produção de frangos de corte*. Campinas: FACTA, 2004. p.1-22

5. Artigos apresentados em congressos, reuniões, seminários etc

Malhado CHM, Piccinin A, Gimenez JN, Ramos AA, Gonçalves HC. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: *Anais do 3o Congresso Nordeste de Produção Animal; 2004, Campina Grande. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba; 2004. p.1-3*

6. Teses, dissertações e outros trabalhos acadêmicos

Mortari AC. *Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em cães [dissertação]*. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.

7. Publicações disponíveis na Internet

Vasconcelos JLM. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. Campinas; 2004 [cited 2004 Jan 16]. Available from: <<http://www.milkpoint.com.br>>.

ARTIGO CIENTÍFICO A SER ENVIADO PARA REVISTA “VETERINÁRIA E ZOOTECNIA”

USO DO ÁCIDO MEFENÂMICO EM RECEPTORAS DE EMBRIÕES EQUINOS

USE OF MEFENAMIC ACID IN EQUINE EMBRYOS RECIPIENTS

USO DEL ÁCIDO MEFENÁMICO EN RECEPTORAS DE EMBRIONES EQUINOS

Tatiana Cabrera 1,2
José Antônio Dell’Aqua Junior 3

1 Agradecimento: FAPESP

2 Mestrando – Depto. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária -FMVZ- UNESP Botucatu.

3 Professor Adjunto – Depto. de Reprodução Animal Radiologia Veterinária-FMVZ-UNESP Botucatu, dellaquajr@uol.com.br

Correspondência para: Prof. Dr. José Antônio Dell’Aqua Junior, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ – UNESP, Distrito de Rubião Jr. s/n. Botucatu – SP – Brasil, CEP 18618-000. Tel: (14) 3811-6249 Fax: (14) 3815-8799.

USO DO ÁCIDO MEFENÂMICO EM RECEPTORAS DE EMBRIÕES EQUINOS

RESUMO

Com o intuito de estender um aceitável intervalo entre a ovulação da receptora e dia da transferência de embrião (TE), o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ácido mefenâmico na capacidade de manutenção da função do corpo lúteo em receptoras que se encontravam no dia 10 do ciclo (D10), bem como verificar as taxas de prenhez após a transferência do embrião. Foram transferidos 48 embriões para receptoras no dia 10 do ciclo divididos em três grupos experimentais: Grupo 1 controle (n=18); Grupo 2 (n=15) receptoras tratadas com 1g de ácido mefenâmico por via oral desde o oitavo até o décimo sexto dia após a ovulação; Grupo 3 (n=15) receptoras tratadas com 1g de ácido mefenâmico por via oral no dia da transferência e por mais dois dias. Seis dias após a transferência dos embriões foi confirmada a gestação por ultrassonografia e repetida aos 30 dias. Para análise das porcentagens de gestação e classificação uterina no dia da TE foi utilizado o Teste de Fisher e para os valores obtidas da dosagem sérica de progesterona foi utilizado o teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey. O grupo controle apresentou 33,3% de taxa de gestação (6/18). Os grupos 2 e 3 apresentaram 40,0% (6/15) e 33,3% (5/15), respectivamente. Nas éguas não gestantes, os três grupos apresentaram queda progressiva na concentração média de progesterona, significativamente a partir do 12º dia pós ovulação, não havendo interferência no tempo da ocorrência da luteólise. As taxa de prenhez em receptoras D10 apresentaram índices satisfatórios em receptoras com bom tônus uterino e cervical no dia da TE. Conclui-se que o ácido mefenâmico não impediu a luteólise e não melhorou as taxas de prenhez das receptoras no dia 10 do ciclo estral.

Palavras chave: ácido mefenâmico, éguas, progesterona, receptora, transferência de embrião.

USE OF MEFENAMIC ACID IN EQUINE EMBRYOS RECIPIENTS

ABSTRACT

In order to extend an acceptable interval between ovulation of the recipient and the day of the embryo transfer (ET), the purpose of this study was to evaluate the effect of mefenamic acid in the ability to maintain corpus luteum function in recipient mares that were on Day 10 (D10) of the estrous cycle, and to verify the pregnancy rate after embryo transfer. 48 embryos were transferred into recipients on Day 10 of the cycle divided into three experimental groups: Group 1 control (n = 18); Group 2 (n = 15) recipients treated with 1g mefenamic acid orally since the eighth until the tenth sixth days after ovulation; Group 3 (n = 15) recipients treated with 1g mefenamic acid orally on day of transfer and for two more days. Six days after ET, pregnancy was confirmed by ultrasound and repeated at 30 days. For analysis of percentages of pregnancy and classification uterine on ET day was used Fisher's exact test and the values obtained from the serum progesterone was used ANOVA followed by Tukey test. The control group showed a 33.3% pregnancy rate (6/18). Groups 2 and 3 presented 40.0% (6/15) and 33.3% (5/15), respectively. In non-pregnant mares, all three groups showed a progressive decrease in the mean concentration of progesterone significantly from day 12 post ovulation, without interference in the time of the occurrence of luteolysis. The pregnancy rate in recipients on Day 10 showed satisfactory rates in recipients with good uterine tone and neck on the day of ET. It is concluded that mefenamic acid did not prevent luteolysis and did not improve pregnancy rates of recipients on day 10 of the estrous cycle.

Key words: mefenamic acid, mares, progesterone, recipient, embryo transfer.

USO DEL ÁCIDO MEFENÁMICO EN RECEPTORAS DE EMBRIONES EQUINOS

RESUMEN

Con el fin de extender un intervalo aceptable entre la ovulación de la receptora y el día de la transferencia de embriones (TE), el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del ácido mefenámico en la capacidad de mantener la función del cuerpo lúteo en las yeguas receptoras que estaban en los 10 días del ciclo estral (D10), y verificar la tasa de gestación después de la transferencia de embriones. 48 embriones fueron transferidos en receptoras en el día 10 del ciclo divididas en tres grupos experimentales: Grupo 1 control (n = 18); Grupo 2 (n = 15) receptoras tratadas con 1 g de ácido mefenámico por vía oral desde el octavo hasta el décimo sexto días después de la ovulación y Grupo 3 (n = 15) receptoras tratados con 1 g de ácido mefenámico por vía oral en el día de la transferencia y durante mas dos días más. Seis días después de la TE, la gestación fue confirmada por ecografía y repitió a los 30 días. Para el análisis de los porcentajes de la gestación y la clasificación uterina en el día de la TE se utilizó la prueba exacta de Fisher y los valores obtenidos en la prueba de progesterona sérica se utilizó la prueba ANOVA seguido por la prueba de Tukey. El grupo control mostró una tasa de gestación del 33,3% (6/18). Grupos 2 y 3 mostraron el 40,0% (6/15) y el 33,3% (5/15), respectivamente. En las yeguas no preñadas, los tres grupos mostraron una disminución progresiva de la concentración media de progesterona significativamente 12 días después de la ovulación, sin interferencia en el momento de la ocurrencia de la luteólisis. La tasa de gestación en las receptora D10 mostró tasas satisfactorias en las yeguas con tono apropiado del útero y el cuello en el día de la TE. Se concluye que el ácido mefenámico no impidió la luteólisis y no mejoró las tasas de gestación de las receptoras en el día 10 del ciclo estral.

Palabras clave: ácido mefenámico, yeguas, progesterona, receptora, transferencia de embrión.

1 INTRODUÇÃO

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

Os índices de recuperação embrionária e taxas de prenhez pós inovulação determinam a eficiência de um programa de TE. Fatores inerentes às doadoras, receptoras e ao próprio embrião têm sido cada vez mais estudados com intuito de minimizar estas perdas e aumentar o sucesso da transferência. Segundo VANDERWALL (1), a seleção e o manejo adequados de éguas receptoras podem ser os fatores mais importantes para o sucesso de um Programa de Transferência de Embriões em Eqüinos.

No reconhecimento materno da gestação o conceito sinaliza ao organismo materno para prolongar a vida do corpo luteo primário e assim assegurar um contínuo suplemento de progesterona cuja sobrevivência embrionária e desenvolvimento são criticamente dependentes (2,3,4). A incidência de morte embrionária antes dos sessenta dias de gestação varia de 2.6% a 24%, apresentando uma média de 8,6%, o que gera grandes prejuízos na criação eqüina (5).

O ambiente uterino se altera marcadamente sobre a influência da progesterona e um embrião exposto a um útero assincrônico pode estar sujeito a fatores de desenvolvimento e níveis hormonais não correspondentes a fase na qual ele se encontra (6). Assim, o intervalo de ovulação entre receptora e doadora deve ser levado em conta na seleção da receptora. A utilização de receptoras em condições naturais antes de quatro dias após a ovulação não tem sido recomendado na literatura, observando-se que, a partir do 9º dia, a taxa de prenhez piora bastante após a transferência, inviabilizando a utilização a partir deste dia (7).

Wilsher et al. (8) investigaram o efeito do tratamento com o antiinflamatório ácido meclofenâmico em receptoras ovuladas 2 e 3 dias antes da doadora e observaram que o índice de prenhez em receptoras tratadas e não tratadas foi de 81% e 44%, respectivamente. O aumento no período de utilização da receptora é sempre um desafio que possibilita recompensas na redução do custo da TE em equinos (9).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ácido mefenâmico na capacidade de manutenção da função do corpo lúteo em receptoras que se encontravam no dia 10 do ciclo (D10), bem como verificar as taxas de prenhez após a TE.

1 MATERIAL E MÉTODOS

3 Local e período

5 O presente trabalho foi realizado na central equina de reprodução Genetic Jump, na
6 Fazenda Haras Santa Maria, localizado no município de Itapetininga, SP durante os meses de
7 setembro e outubro das estações reprodutivas de 2009/10 e 2010/11.

9 Animais

11 Foi utilizado um total de quarenta éguas mestiças com idade entre 4 e 10 anos, escore
12 corporal 3 a 4 (1-5). Todos os animais estavam em plena atividade reprodutiva e não
13 possuíam quaisquer anormalidades no trato reprodutivo que pudessem ser detectadas por
14 exame de palpação, citologia uterina ou ultrassonografia transretal. As éguas eram mantidas
15 em sistema de confinamento com acesso a água, silagem de milho e sal mineral à vontade,
16 tendo sua alimentação complementada com 2 kg de ração comercial peletizada própria para
17 equinos uma vez ao dia. Dois garanhões com fertilidade comprovada foram utilizados como
18 doadores de sêmen.

20 Delineamento experimental

22 As éguas utilizadas como receptoras tiveram seu ciclo acompanhado através de
23 palpação retal e ultrassonografia. Ao atingirem folículo de aproximadamente 35 mm e
24 presença de edema uterino foram induzidas com 1mg de deslorelina I.M. Após confirmação
25 da ovulação as receptoras eram distribuídas aleatoriamente em 3 grupos experimentais:

27 *Grupo 1 (n=18)

28 Receptoras com dez dias de ovulação foram utilizadas como controle

30 *Grupo 2(n=15)

31 Receptoras com dez dias de ovulação tratadas com 1g de ácido mefenâmico, via oral, do
32 oitavo ao décimo sexto dia pós ovulação.

34 *Grupo 3 (n=15)

1 Receptoras com dez dias de ovulação tratadas com 1g de ácido mefenâmico, via oral, no dia
2 da transferência e por mais dois dias.

3

4 **Produção dos embriões**

5

6 Foi acompanhado o ciclo das éguas doadoras de embrião através de palpação retal e
7 ultrassonografia. As ovulações da éguas foram induzidas com 1mg de deslorelina I.M. após
8 atingirem folículo de aproximadamente 35 mm e presença de bom edema uterino. Vinte e
9 quatro horas após a indução da ovulação foram inseminadas com 500×10^6 de
10 espermatozoides viáveis. Oito dias após a confirmação da ovulação era realizada a lavagem
11 uterina para recuperação dos embriões.

12

13 **Transferência dos embriões**

14

15 Foram realizadas 48 transferências de embrião. Oito dias após ovulação da doadora
16 (considerando-se D0 como o dia da ovulação) os embriões foram coletados. Apenas embriões
17 considerados excelentes e bons foram transferidos. A técnica de transferência foi a
18 transcervical e não-cirúrgica (10, com modificações), com a deposição do embrião no interior
19 do útero.

20 As receptoras foram avaliadas pela palpação retal e ultrassonografia antes da
21 transferência dos embriões, sendo classificadas como: 1) aceitável – tônus uterino e cervical
22 variando de bom a excelente e 2) não aceitável - pouca tonicidade uterina ou cervical (8). Os
23 embriões foram transferidos aleatoriamente para os 3 grupos de receptoras.

24

25 **Dosagem hormonal**

26

27 Para determinação das concentrações séricas de progesterona, amostras de sangue
28 foram colhidas por venopunção do oitavo ao décimo oitavo dia pós ovulação a cada 24 horas
29 em todos os grupos estudados. As amostras foram colhidas em tubos de ensaio, centrifugadas
30 a 600 G por 10 minutos e o soro sanguíneo congelado a -20°C até a realização das análises
31 por radioimunoensaio.

32

33

34

1 **Diagnóstico de Gestação**

2

3 As receptoras foram examinadas através de ultrassonografia transretal seis dias após a
4 transferência dos embriões para determinar a presença ou não de vesícula embrionária.
5 Quando confirmado, o exame era repetido aos 30 dias.

6

7

8 **Análise Estatística**

9

10 Para análise das porcentagens de gestação entre os grupos estudados foi utilizado o
11 teste de Fisher. E o teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey para as variáveis obtidas da
12 dosagem sérica de progesterona. Todas as estatísticas efetuadas foram consideradas
13 significantes quando $p < 0,05$.

14

15 **RESULTADOS**

16

17 A porcentagem de receptoras que se tornaram prenhes não diferiu estatisticamente
18 entre si, apresentando valores abaixo dos 50% em todos os grupos. As taxas de gestação nos
19 grupos G2 e G3 foram 40,0% (6/15) e 33,3% (5/15), respectivamente. No grupo controle G1,
20 a taxa de gestação foi de 33,3% (6/18).

21 Houve apenas uma morte embrionária no G3. As receptoras dos demais grupos
22 permaneceram gestantes até os 30 dias. Não houve diferença na qualidade dos embriões
23 inovulados, pois foram utilizados apenas os de grau 1 e 2.

24 As concentrações de progesterona nas receptoras gestantes permaneceram constantes
25 em todos os grupos. Nas receptoras não gestantes houve queda semelhante dos níveis de
26 progesterona nos 3 grupos estudados.

27 Baseando no dia em que as éguas não gestantes obtiveram concentrações menores que
28 1 ng/ml de progesterona, obteve-se o tempo médio de intervalo entre a ovulação e a luteólise
29 completa subsequente. No G1 controle o tempo médio foi de 14,33 dias pós ovulação. Nos G2
30 e G3 esse intervalo foi de 14,5 e 14,25 dias, respectivamente.

31 Foi avaliada a influência do tônus uterino no momento da TE sobre as taxas de
32 gestação nas receptoras de embrião. As éguas dos grupos G1, G2 e G3 classificadas como
33 aceitáveis (tônus uterino e cervical variando de bom a excelente) apresentaram índices de
34 prenhez de 85,7% (6/7), 75% (6/8) e 71,4% (5/7), respectivamente. Em relação as éguas

1 classificadas como não aceitáveis (pouca tonicidade uterina ou cervical) a taxa de gestação
2 foi de 0% em todos os grupos. O tônus uterino e cervical exerceram efeito positivo sobre as
3 taxas de gestação, já que as receptoras D10 com bom tônus uterino e cervical no dia da TE
4 apresentaram maiores índices de prenhez, independente de ter ou não recebido o ácido
5 mefenâmico.

6

7 **DISCUSSÃO**

8

9 Na transferência de embrião éguas receptoras que ovulam depois da doadora
10 geralmente são melhores candidatas do que aquelas que ovulam antes, particularmente se a
11 ovulação tiver ocorrido 2 dias antes (11). O uso de receptoras em condições naturais antes de
12 quatro dias após a ovulação não tem sido recomendado na literatura, observando-se que, a
13 partir do 9º dia, a taxa de prenhez piora bastante após a transferência, inviabilizando a
14 utilização a partir deste dia (12). Diferindo desses resultados, Alonso (13) não encontrou
15 diferença nas taxas de prenhez de éguas receptoras de embrião entre os dias 3 e 8 do ciclo.

16 McKinnon e Squires (14) transferiram embriões em receptoras cujos corpos lúteos
17 encontravam-se entre os dias 5 e 10 após a ovulação, não encontrando diferenças
18 significativas ($p > 0,05$) nas taxas de prenhez. Por outro lado, Alvarenga (15) menciona
19 tendência de melhora, embora não-significativa, nos índices de prenhez quando a idade do
20 corpo lúteo decresce, ou seja, aproxima-se do dia da ovulação.

21 No presente estudo, embriões foram transferidos apenas em éguas receptoras ovuladas
22 2 dias antes (D10) da doadora. Verificou-se que com a utilização do ácido mefenâmico nas
23 receptoras do 8º ao 16º dia após ovulação (G2) obteve-se taxa de prenhez de 40,0% (6/15).
24 Nos animais tratados do 10º ao 12º dia pós ovulação (G3) e nas éguas do grupo controle (G1)
25 as taxas de gestação foram 33,3% (6/18) e 33,3% (5/15), respectivamente. Resultados
26 semelhantes foram observados em experimento realizado por Koblischke et al. (16) onde a
27 recoleta embrionária foi maior nas receptoras ovuladas no mesmo dia ou dois dias depois da
28 doadora independente de terem sido ou não tratadas com o ácido meclofenâmico ou o flunixin
29 meglumine.

30 No trabalho de Pool et al. (17) receptoras que ovularam 2 a 3 dias antes da doadora
31 falharam em manter a gestação mesmo sendo tratadas com progestágenos. Valores diferentes,
32 como relatado por Wilsher et al. (18); apresentaram taxas de prenhez de 81% (13/16) em
33 animais que ovularam 2 dias antes (D10) da doadora e que foram tratados com ácido
34 meclofenâmico do nono dia pós ovulação até 7 dias após a transferência do embrião.

1 Em estudo realizado com camelos, animais tratados com ácido meclofenâmico (a
2 partir do 7º dia após ovulação e por mais 8 dias após T.E) apresentaram taxas de prenhez de
3 80%, 60% e 70% transferidos em receptoras D8, D10 e D12, respectivamente. Já nos animais
4 do grupo controle o percentual de gestação foi de apenas 10%, cujos embriões foram
5 transferidos em receptoras não tratadas no dia 8 pós ovulação (19).

6 Analisando os dados obtidos nas éguas dos 3 grupos pode-se observar que a taxa de
7 gestação foi baixa (20) sugere que a fixação embrionária ocorre pela interação do aumento do
8 tônus uterino, aumento do tamanho da vesícula embrionária e um impedimento físico para
9 mais movimentos causados pela brusca curvatura ou flexura do corno uterino neste ponto.

10 Nos 3 grupos deste experimento as concentrações de progesterona permaneceram
11 praticamente constantes nas éguas gestantes. Nas éguas não gestantes a concentração
12 diminuiu gradativamente, principalmente a partir do 12º dia pós ovulação.

13 Houve apenas uma morte embrionária no G3. As receptoras dos demais grupos
14 permaneceram gestantes até os 30 dias. A perda embrionária tem sido relacionada à baixa
15 concentração de progesterona no início da prenhez (21, 22). Não houve diferença na
16 qualidade dos embriões inovulados, pois foram utilizados apenas os de grau 1 e 2, de acordo
17 com McKinnon e Squires (14).

18 Resultados diferentes em relação à progesterona foram encontrados por Caiado et al.
19 (7) com o uso de outros antiinflamatórios como o flunixin meglumine; cujas concentrações
20 plasmáticas de P4 foram maiores nas receptoras tratadas. Contudo, a taxa de prenhez foi de
21 55% (11/20) e 75% (15/20) em éguas tratadas e não tratadas, respectivamente.

22 Wilsher et al. (23) trabalhando com embriões D10 e os transferindo em uma janela de
23 sincronia entre -4 (D14) e +9 (D1) relataram que a quantidade de progesterona produzida pela
24 receptora com relação ao seu tempo de ovulação não pareceu ser um pré requisito para a
25 sobrevivência do embrião. Eles observaram que houve influência no desenvolvimento
26 embrionário quando não estão em sincronia, já que retardou o crescimento e a formação do
27 alantóide .E, que independente da sincronia o tempo de fixação embrionária foi de 17 dias.

28 Vanderwall et al. (1) demonstraram que embriões da espécie equina secretam
29 prostaglandina E2 (PGE2) e a ação da PGE2 no transporte ovidutal de embriões equinos foi
30 demonstrada por Woods et al. (1991). Por inibir outras prostaglandinas, o flunixin meglumine
31 poderia inibir também a síntese de PG E2 produzida pelo embrião equino, ocorrendo uma
32 diminuição das contrações uterinas e conseqüentemente inibição da mobilidade embrionária o
33 que pode ter afetado o reconhecimento materno da gestação, justificando a menor taxa de
34 prenhez do grupo tratado com esta droga (7).

1 Skidmore et al. (24) também observaram uma menor taxa de gestação em animais
2 tratados com o flunixin meglumine. Foi sugerido que a manipulação e distensão da vagina e
3 cervix pudessem estimular a secreção endógena de $PGF2\alpha$ do endométrio, o que poderia
4 induzir luteólise prematura e perda da prenhez. Doze camelos receberam 500 mg de
5 antiprostaglandínico, flunixin meglumine, 15 minutos antes da transferência. Amostras de
6 sangue foram colhidas em intervalos regulares. Os resultados mostraram que a estimulação da
7 cervix causou uma leve liberação de $PGF2\alpha$ que foi suprimido pelo flunixin meglumine.
8 Entretanto, a luteólise prematura não ocorreu indicando que a quantidade de $PGF2\alpha$ liberada
9 foi insuficiente para causar qualquer prejuízo na função luteal. As receptoras tratadas
10 obtiveram uma taxa de gestação de 16% (2/12) e os animais controle de 67% (10/15).

11 Os fenamatos impedem que prostaglandinas já formadas se liguem a receptores de
12 $PGE2$ (25). Entretanto, Koblieschke et al. (16) observaram que o ácido meclofenâmico teve
13 um menor efeito sobre a expressão do mRNA para $PGES$, em relação ao flunixin
14 meglumine. O PGE , além de seu papel na inflamação, está envolvido no reconhecimento
15 maternal da gestação e estimula a mobilidade intrauterina do concepto equino entre 9 a 16
16 dias pós ovulação (20, 26). Segundo Mcdowell et al. (27) o tratamento de éguas com flunixin
17 meglumine durante a fase de reconhecimento materno da gestação bloqueou a mobilidade
18 embrionária neste período.

19 Como não houve seleção de receptora baseado nas características uterinas no
20 momento da TE, as taxas de prenhez das receptoras dos diferentes grupos podem ter sofrido
21 influência. Em experimento realizado por Carnevale et al. (28) éguas que foram classificadas
22 como marginais apresentaram taxas de prenhez estatisticamente inferiores às das éguas
23 classificadas como aceitáveis (70,3% versus 56,2%).

24 O uso deste antiprostaglandínico não interferiu significativamente com os níveis
25 séricos de progesterona. Além disso, foi observado também que não houve relação entre taxas
26 de prenhez e níveis de progesterona. Em trabalho realizado por Duarte e Vieira (29) também
27 foi demonstrado correlação entre tensão uterina e taxa de gestação, onde éguas com tônus
28 uterino moderado a intenso apresentaram taxas de prenhez de 79,3%, já os animais com tônus
29 uterino ausente ou fraco os índices de prenhez foram 36,8%.

30 No presente trabalho o uso do antiinflamatório ácido mefenâmico também não foi
31 capaz de aumentar a longevidade ou inibir a ocorrência de lise do corpo lúteo. De acordo com
32 esses resultados, Wilsher et al. (8) também relatam que a luteólise não pôde ser evitada com o
33 ácido meclofenâmico nas éguas que não ficaram gestantes. O tempo médio (dias) do início

1 do estro, ou seja, níveis de progesterona abaixo de 1ng/ml (30, 31) foi de 14,5 e 14,2 dias nos
2 grupos 2 e 3. No grupo 1 (controle) o tempo médio foi de 14,3 dias.

3 Neste estudo as receptoras dos grupos 1, 2 e 3 que apresentaram tônus uterino e
4 cervical de bom a excelente no dia da te, obtiveram taxas de gestação de 75%, 85,7% e
5 71,4%, respectivamente. Segundo Carnevale et al. (28), o tônus uterino reduzido pode indicar
6 um ambiente uterino não compatível com o crescimento e desenvolvimento embrionário.
7 Éguas com tônus uterino ruim a pobre podem ter concentrações de progesterona circulantes
8 mais baixas, o que poderia afetar o tônus uterino e cervical (32).

9 Verificou-se também neste trabalho que o índice de gestação foi significativamente
10 maior nas éguas que apresentaram tônus uterino e cervical de bom a excelente no momento da
11 inovulação do embrião, independente de ter recebido ou não o tratamento com ácido
12 mefenâmico.

13 Corroborando com esses resultados, Alonso (13) também reportaram em seu
14 experimento maior taxa de prenhez em éguas com tônus uterino 1 no dia da TE. E as
15 receptoras com tônus uterino 2 apresentaram taxa de prenhez estatisticamente maior em
16 relação às éguas com tônus uterino 3. É citado também a provável relação entre a
17 concentração de estrógeno no estro sobre a expressão de receptores de progesterona no
18 endométrio, os quais afetariam as características uterinas no dia da TE.

19 A utilização de receptoras D10 seria uma alternativa na transferência de embrião desde
20 que as mesmas apresentem adequado tônus uterino no momento da te.

23 **Conclusões**

24
25 Os resultados obtidos no presente experimento permitem concluir que o ácido
26 mefenâmico não melhorou as taxas de prenhez em receptoras D10, não interferiu na
27 concentração sérica de progesterona e nem no tônus uterino.

28
29
30
31
32
33
34

1 REFERÊNCIAS

2
3 (1) Vanderwall DK, Woods GL, Weber J. ^a, Lichtenwalner AB. PGE 2 secretion by the
4 conceptus and binding by non- pregnant endometrium in the horse. Equine Veterinary Journal.
5 1993;15: 24- 27.

6
7 (2) Allen WR. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. Reproduction of
8 Domestic Animals. 2001; 36:121-131.

9
10 (3) Kastelic JP, Adams GP, Ginther OJ. Role of progesterone in mobility, fixation, orientation,
11 and survival of the equine embryonic vesicle. Theriogenology. 1987; 27:655-663.

12
13 (4) Spencer TE, Burghart RC, Johnson GA, Bazer FW. Conceptus signals for establishment
14 and maintenance of pregnancy. Animal Reproduction Science.2004; 82-83: 537-550.

15
16 (5) Vanderwall DK. Early embryonic loss in the mare. Journal of Equine Veterinary
17 Science.2008; 28: 691-702.

18
19 (6) Barnes FL. The effects of the early uterine environment on the subsequent development of
20 embryo and fetus. Theriogenology. 2000; 53: 649-658.

21
22 (7) Caiado JRC, Fonseca FA, Silva, JFS, Caiado JCC, Fontes RS. Aplicação do flunixin
23 meglumine antes da transferência não cirúrgica de embriões em éguas da raça Mangalarga
24 Marchador. Revista Brasileira de Cirurgia Veterinária. 2005; 12:11-15.

25
26 (8) Wilsher S, Kolling M, Allen WR. The use of meclofenamic acid to extend donor-recipient
27 asynchrony in equine embryo transfer. Havemeyer Foundation Monograph series 2004; 16:.8-
28 9.

29 (9) Jasko DJ. Comparison of pregnancy rates following nonsurgical transfer of day 8 embryos
30 using various transfer devices. Theriogenology. 2002; 58:713-715.

31
32 (10) Riera FL, Mcdonough J. Commercial embryo transfer in polo ponies in Argentina.
33 Equine Veterinary Journal. 1993; 15:116-119.

- 1 (11) Mckinnon AO & Voss JL. In: Mckinnon, Equine Reproduction., Malvern: Lea & Febizer.
2 1992; 19: 179 –185.
3
- 4 (12) Caiado JRC, Fonseca FA, Silva JFS, Fontes RS. Tratamento de éguas receptoras de
5 embriões visando sua utilização no segundo dia pós ovulação. Revista Brasileira de
6 Zootecnia. 2007, 36: 360-368.
7
- 8 (13) ALONSO, M.A. Efeito das características uterinas e dia do ciclo na taxa de prenhez e
9 níveis séricos de progesterona em éguas candidatas à receptora de embrião. 2007. 72 f.
10 Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)- Faculdade de Medicina Veterinária e
11 Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, 2007.
12
- 13 (14) MCKINNON AO, SQUIRES EL. Morfologic assesment of the equine embryo. Journal
14 of American Veterinary Medical Association.1988;192: 401-406.
15
- 16 (15) ALVARENGA MA. Efeito de alguns fatores sobre índices de coleta e transferência de
17 embriões em eqüinos (dissertação). Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e
18 Zootecnia– UNESP, 1989.
19
- 20 (16) Koblischke P, Kindahl H, Budik S, Aurich J, Palm, Walter I, Kolodziejek J, Nowotny N,
21 Hoppen HO, Aurich C. Embryo transfer induces a subclinical endometrits in recipients mares
22 which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs.
23 Theriogenology. 2008; 70:1147-1158.
24
- 25 (17) Pool KF, Wilson JM, Webb GW, Kraemer DC, Potter GD, Evans JW. Exogenous
26 hormone regimes to utilise successfully mares in dioestrus (Days 2 to 14 after ovulation) as
27 embryo transfer recipients. Journal of Reproduction and Fertility. 1987; 35: p.429- 432.
28
- 29 (18) Wilsher S, Kolling M, Alen WR. Meclofenamic acid extends donor recipient asynchrony
30 in equine embryo transfer. Equine Veteterinary Journal. 2006; 38: 428-432.
31
- 32 (19) Skidmore JA, Billah M. Embryo transfer in the dromedary camel using asynchronous,
33 meclofenamic acid- treated recipients. Reproduction, Fertility and development. 2005; 17:
34 p.417-21.

- 1 (20) Ginther OJ. Mobility of the equine conceptus. *Theriogenology*. 1983; 19:603-11.
2
- 3 (21) Douglas RH, Burns PJ, Hershman, L. Physiological and commercial parameters for
4 producing progeny from subfertile mares by embryo transfer. *Equine Veterinary Journal*.
5 1985; 3: 111-114.
6
- 7 (22) Ginther OJ. Dinamic physical interaction between the equine embryo and uterus. *Equine*
8 *Veterinary Journal*. 1985; 3: 41 – 47.
9
- 10 (23) Wilsher, S.; Cluton-Brock, A.; Allen, W.R. Successful transfer of day 10 horse embryos:
11 influence of donor-recipient asynchrony on embryo development. *Reproduction*. 2010; 139:
12 p.575-585.
13
- 14 (24) Skidmore JA, Billah M, Allen WR. Investigation of factors affecting pregnancy rate after
15 embryo transfer in dromedary camels. *Reproduction Fertility and Development*. 2002; 14:
16 109-16.
17
- 18 (25) Rees MCP, Canete-Soler R, Bernal AL, Turnbull AC. Effect of fenamates on
19 prostaglandin e receptor binding. *THE LANCET SEP 3*. 1988; 541: 542.
20
- 21 (26) Stout TAE, Allen WR. Prostaglandin E2 and F2_α production by equine conceptuses and
22 concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and
23 dioestrous mares. *Journals of Reproduction and Fertility*. 2002; 123: 261-268.
24
- 25 (27) Mcdowell KJ, Sharp DC, Grubaugh W, Thatcher WW, Wilcox CJ. Restricted conceptus
26 mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. *Biology of Reproduction*. 1988;
27 39: 340-348.
28
- 29 (28) Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwall DK, Mccue PM.
30 Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death equine embryo transfer.
31 *Theriogenology*. 2000;54: 965-979.
32
- 33 (29) Duarte MB, Vieira RC. Efeito da fenilbutazona sobre as taxas de prenhez em éguas
34 receptoras de embriões. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2003; 31: 32.

- 1 (30) Vivo R, Santisteban R, Tovar P, Castejon MF. Valores de progesterona en plasma de
2 yeguas españolas y arabes durante el ciclo reproductor. Archivos de Zootecnia.1986; 35: 59-
3 67.
4
- 5 (31) Oba E, Moreira AF, Mamprim MJ. Progesterone and LH serum concentration in adult
6 mares during oestrus. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION,
7 12., Netherlands. Free communications. Hague; 1992. p.1900-1902.
8
- 9 (32) GINTHER, O.J. Reproductive biology of the mare: basic and applied Aspects, 2ed. Cross
10 Plains, Equiservices: Wisconsin, 1992; p.377.
11
12
13
14
15
16
17